

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E BIOQUÍMICA

Naira Buzzo Anhesine

**Oxidoreductase de *Maytenus*: seu papel na biossíntese dos derivados  
friedelânicos**

Araraquara

2022

NAIRA BUZZO ANHESINE

**Oxidoreductase de *Maytenus*: seu papel na biossíntese dos derivados  
friedelânicos**

Tese apresentada ao Instituto de Química -  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutora em  
Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maysa Furlan

Araraquara  
2022

A596o Anhesine, Naira Buzzo  
Oxidoreductase de Maytenus : seu papel na biossíntese dos derivados friedelânicos / Naira Buzzo Anhesine. -- Araraquara, 2022  
102 f. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara  
Orientadora: Maysa Furlan

1. Maytenus. 2. Espinheira Santa. 3. Biossíntese. 4. Terpenos. 5. Transcriptoma. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: "Oxidoreductase de *Maytenus*: seu papel na biossíntese dos derivados friedelânicos"

**AUTORA: NAIRA BUZZO ANHESINE**

**ORIENTADORA: MAYSA FURLAN**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> MAYSA FURLAN (Participação Virtual)  
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LUIS OCTÁVIO REGASINI (Participação Virtual)  
Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto



Profa. Dra. DEBORA CRISTINA BALDOQUI (Participação Virtual)  
Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá - UEM - Maringá



Prof. Dr. FERNANDO COTINGUIBA DA SILVA (Participação Virtual)  
Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors - UFRJ - Rio de Janeiro



Profa. Dra. MÔNICA TALLARICO PUPO (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 06 de julho de 2022

## DADOS CURRICULARES

### Naira Buzzo Anhesine

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

Endereço: Rua Dr. Francisco Degni 55, CEP 14800-060, Araraquara/SP, Brasil.

E-mail: [nbanhesine@hotmail.com](mailto:nbanhesine@hotmail.com)

### Formação Acadêmica.....

#### 2022 – 2018 **Doutorado em Química**

- Área de Concentração: Química Orgânica
- Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)
- Projeto: Oxidoreductase de *Maytenus*: seu papel na biossíntese dos derivados friedelânicos
- Agência financiadora: CNPq (#142002/2018-6)
- Orientador: Profa. Dra. Maysa Furlan ([maysa.furlan@unesp.br](mailto:maysa.furlan@unesp.br))

#### 2018 – 2016 **Mestrado em Química**

- Área de Concentração: Química Orgânica
- Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)
- Projeto: Perfil cromatográfico (*fingerprinting*) por LC-DAD-MS de espécies do gênero *Erythrina*: desenvolvimento e validação de método para controle de qualidade de drogas vegetais.
- Agência financiadora: FAPESP (#2016/09235-9)
- Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro ([albjcava@iq.unesp.br](mailto:albjcava@iq.unesp.br))

#### 2015 – 2014 **Iniciação Científica**

- Área de Concentração: Química Orgânica
- Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)
- Projeto: Documentação química de espécies do gênero *Casearia* (Salicaceae) de importância ecológica, econômica e medicinal.
- Agência financiadora: FAPESP (#2014/02738-0)
- Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro ([albjcava@iq.unesp.br](mailto:albjcava@iq.unesp.br))

## 2016 – 2012 **Bacharelado em Química**

- Instituição: Instituto de Química de Araraquara (IQ-UNESP)

## **Experiências Didáticas**.....

### 2019 **Estágio Docência**

- Disciplina: Preparo e Caracterização de Compostos Orgânicos
- Aulas ministradas: Segurança em Laboratório, Solubilidade e Análise Elementar e Caracterização das Funções Orgânicas
- Curso: Bacharelado em Química
- Supervisora: Profa. Dra. Angela Regina Araújo ([angela.araujo@unesp.br](mailto:angela.araujo@unesp.br))

### 2016 **Estágio Docência**

- Disciplina: Química Orgânica Experimental
- Aulas ministradas: Segurança em Laboratório e Extração e Purificação do Limoneno
- Curso: Engenharia Química
- Supervisor: Prof. Dr. Humberto M. S. Milagre ([humbertomilagre@iq.unesp.br](mailto:humbertomilagre@iq.unesp.br))

## **Prêmios**.....

### 2017 **International Younger Chemists Network (IYCN). Frühjahrssymposium (Spring Symposium).** Mainz, Alemanha.

- *Erythrina alkaloids' Chromatographic Fingerprinting and Method Development.*

Dentre as submissões feitas por químicos recém formados de países em desenvolvimento, o trabalho "*Erythrina Alkaloids' Chromatographic Fingerprinting and Method Development*" foi um dos premiados com uma bolsa oferecida pela International Younger Chemists Network (IYCN) e a German Chemical Society para ser apresentado no *Spring Symposium (Frühjahrssymposium)* em Mainz, Alemanha.

### 2016 **Concurso Biota Empreendedorismo para alunos de pós-graduação de instituições paulistas: Estímulo a jovens criativos e empreendedores.**

- Projeto: Fitoquímicos de plantas para áreas degradadas.

Projeto que contempla o desenvolvimento e utilização de um dispositivo de extração inovador, ambientalmente amigável e eficiente no processo de produção bem como estratégias de cultivo sustentável com base no reflorestamento de áreas degradadas para obtenção de diversificados produtos de interesse industrial e econômico.

#### **Artigos Publicados.....**

Bueno, P. C. P.; Abarca, L. F. S.; Anhesine, N. B.; Giffoni, M. S.; Pereira, F. M. V.; Torres, R. B.; Sousa, R. W. R.; Ferreira, P. M. P.; Pessoa, C.; Cavalheiro, A. J. Intraspecific chemical variability and biological activity of *Casearia sylvestris* from different brazilian biomes. **Planta Medica**, v. 87, p. 148-159, 2021.

Anhesine, N. B.; Bueno, P. C. P.; Torres, R. B.; Lopes, N. P.; Cavalheiro, A. J. Non-polar and polar chemical profiling of six *Casearia* species (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 87. p. 1-7, 2019.

Bueno, P. C. P.; Passareli, F.; Anhesine, N. B.; Torres, R. B.; Cavalheiro, A. J. Flavonoids from *Casearia sylvestris* Swartz variety *língua* (Salicaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 68, p. 23-26, 2016.

#### **Participação em Eventos Científicos.....**

2021 e-Poster: 44<sup>a</sup> Reunião Anual Virtual da SBQ.

2021 Simpósio online: “Waters LC Symposium” – Waters Corporation.

2020 Webinar: “Cromatografia Líquida: como conceitos básicos podem ajudar nos desafios do dia a dia do laboratório” – Waters Corporation.

2020 Webinar: “Como tornar seu método HPLC um sucesso?” – Waters Corporation.

2017 Poster: IUPAC 49<sup>th</sup> General Assembly. São Paulo/SP, Brasil.

2017 Poster: Spring Symposium (Frühjahrssymposium). Mainz, Alemanha.

2015 Poster: 5<sup>th</sup> Brazilian Conference on Natural Products – BCNP and XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM. Atibaia/SP, Brasil.

2015 Poster: XXVII Congresso de Iniciação Científica – CIC. Araraquara/SP, Brasil.

2014 Poster: Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins. Campos do Jordão/SP, Brasil.

2014 Poster: XXVI Congresso de Iniciação Científica – CIC. Araraquara/SP, Brasil.

**Idiomas.....**

- Inglês (avançado)

*Dedico este trabalho aos meus queridos e amados avós, vó  
Júlia e vô Hélio, que sempre me incentivaram a estudar e  
que todos os dias pediam à Deus pelo meu sucesso  
profissional e pessoal.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças para superar as dificuldades.

À toda a minha família, em especial meu pai, minha mãe, minha querida avó que faleceu em 2021 e meu querido avô que faleceu em 2022 por todo o amor incondicional, apoio e incentivo durante as etapas da minha vida, por sempre estarem presentes me aconselhando e me guiando e por serem os exemplos que eu sigo com tanto carinho.

Ao meu noivo, Renan Zanetti, pessoa que admiro muito, por todo o amor, carinho, atenção, por me apoiar e me encorajar nas tomadas de decisões e por sempre me tranquilizar nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maysa Furlan, pela atenciosa orientação, pela oportunidade de trabalho, por sempre estar disponível quando precisei e por todo o ensinamento fornecido.

Ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, por disponibilizar o laboratório de Biologia Molecular e possibilitar a realização do trabalho.

Aos técnicos Mariana Marchi Santoni (Biologia Molecular), Nivaldo Boralle (RMN), João Bronzel e Juliana Rodrigues (NuBBE II) pela colaboração durante os experimentos e rotina no laboratório.

Ao CNPq pela bolsa concedida (#142002/2018-6) e à FAPESP e CAPES (código de financiamento 001) pelo suporte.

Ao Instituto de Química e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara.

A todos que fizeram parte da minha formação e que tornaram este trabalho possível.

*“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light”*

– Albus Percival Wulfric Brian Dumbledore

## Resumo

A espécie *Maytenus ilicifolia*, Celastraceae, é popularmente conhecida como “espinheira-santa” e suas folhas são amplamente utilizadas na forma de chá na medicina popular para o tratamento de úlceras e gastrites estomacais. Estudos químicos e biológicos relatam outras atividades tais como contraceptiva, analgésica, anti-inflamatória, antipirética, antioxidante entre outras, que estão intimamente relacionadas com a presença de flavonoides, taninos e terpenos. Os triterpenos pentacíclicos (C30) é a subclasse que merece destaque em espécies do gênero *Maytenus*, dentre eles a friedelina e friedelan-3-ol, os quais são as substâncias mais abundantes no extrato de baixa polaridade das folhas de *M. ilicifolia*. A friedelina é uma substância de grande interesse terapêutico, pois além de ser precursora de substâncias com potencial antitumoral tais como maitenina e pristimerina, ambos terpenos quinonametídeos, ela apresenta atividades biológicas intrínsecas atuando como anti-inflamatório, analgésico, antipirético, antimicrobiano e gastroprotetor. Do ponto de vista biossintético, a friedelina é o único triterpeno pentacíclico que se apresenta oxidado no carbono 3 (C-3) como cetona e o mecanismo proposto de formação desta função não passa pela formação de uma forma enólica. No entanto, espécies de Celastraceae, especialmente do gênero *Maytenus*, mostram, nas suas partes aéreas, o acúmulo concomitante de friedelina e seu derivado reduzido, friedelan-3-ol, suscitando assim, interessantes aspectos biossintéticos a serem investigados. Neste contexto, o objetivo é identificar e caracterizar uma enzima do tipo redutase, que a princípio ainda não foi identificada em plantas, capaz de reduzir um grupo cetônico na posição C-3 de terpenos em seus derivados alcoólicos utilizando ferramentas da biologia molecular e microbiologia. A abordagem empregada consistiu em construir uma base de dados de enzimas 3-ceto redutase, uma subclasse de “*Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR)*”, cuja função enzimática é oxidoreductase atuando em C-3 em rotas biossintéticas de fungos (ERG27) e vertebrados (HSD17B7), e alinhá-la aos transcriptomas de *M. ilicifolia* e de *Quercus suber*, espécie igualmente rica em friedelina e friedelan-3-ol. Posteriormente, foi realizada análise cruzada de ambos os transcriptomas para filtrar os transcritos em comum resultando em três promissores: 45855\_i6, 52338\_i1 e 52338\_i6. Eles foram clonados por tecnologia Gateway e transformados em levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada juntamente com o

gene da friedelina sintase cuja função era fornecer o substrato (friedelina) para a enzima oxidoreductase de interesse. A expressão heteróloga destes transcritos e a análise dos metabólitos extraídos por CG-EM sugerem que os mesmos não sejam os responsáveis pela redução em C-3 uma vez que não foi observado a presença de friedelan-3-ol nos cromatogramas. De qualquer forma, não se exclui a possibilidade de que outro transcrito presente no transcriptoma possa ser o responsável por essa redução, seja ele codificador de uma enzima do tipo 3-ceto redutase ou de outra subclasse de SDR. Acredita-se que exista sim uma enzima em plantas que seja homóloga ao ERG27 em fungos e ao HSD17B7 em vertebrados que faz essa redução em C-3 e o presente estudo já é um grande material de partida para pesquisas futuras que têm como objetivo a busca por tal enzima.

**Palavras-chave:** *Maytenus*; terpenos; friedelina; friedelan-3-ol; transcriptoma.

## Abstract

*Maytenus ilicifolia*, Celastraceae, is popularly known as “espinheira-santa” and its leaves are used as tea in folk medicine for the treatment of stomach ulcers and gastritis. Chemical and biological studies described other activities such as contraceptive, analgesic, anti-inflammatory, antipyretic, antioxidant, among others, which are closely related to the presence of flavonoids, tannins and terpenes. Pentacyclic triterpenes (C30) is a subclass that deserves to be highlighted in species of the genus *Maytenus*, including friedelin and friedelan-3-ol, which are the most abundant compounds in the non-polar extract of *M. ilicifolia* leaves. Friedelin is a compound of great therapeutic interest, as in addition to being a precursor of substances with antitumor potential such as maytenin and pristimerin, both quinonemethide triterpenes, it has intrinsic biological activities acting as anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, antimicrobial and gastroprotective. From a biosynthetic point of view, friedelin is the only pentacyclic triterpene that is oxidized at carbon 3 (C-3) as a ketone and the proposed mechanism for the formation of this function does not involve the formation of an enol form. However, Celastraceae species, especially of the *Maytenus* genus, show, in their aerial parts, the concomitant accumulation of friedelin and its reduced derivative, friedelan-3-ol, thus raising interesting biosynthetic aspects to be investigated. In this context, this project aims to identify and characterize a reductase-like enzyme, which hasn't been identified in plants yet, that is capable of reducing a ketone group at the C-3 position of terpenes in its alcoholic derivatives using molecular biology and microbiology tools. The approach considered in the present work consisted of building a database of 3-keto reductase enzymes, a subclass of “Short-Chain Dehydrogenase/Reductase (SDR)” whose enzymatic function is C-3 oxidoreductase in fungal (ERG27) and vertebrates (HS17B7) biosynthetic pathways, and aligning it to the transcriptomes of *M. ilicifolia* and *Quercus suber*, a species equally rich in friedelin and friedelan-3-ol. Subsequently, cross analysis of both transcriptomes was performed to filter the transcripts in common, resulting in three promising ones: 45855\_i6, 52338\_i1 and 52338\_i6. They were cloned by Gateway technology and transformed into genetically modified yeast *Saccharomyces cerevisiae* together with the friedelin synthase gene whose function was to provide the substrate (friedelin) for the enzyme of interest. A heterologous expression of these transcripts and an analysis of the extracted

metabolites by GC-MS suggested that they are not responsible for the reduction in C-3 since the presence of friedelan-3-ol in the chromatograms was not observed. In any case, it is not excluded the possibility that another transcript may be responsible for this reduction, whether encoding an enzyme of the 3-ketoreductase type or another subclass of SDR. It is believed that there is indeed an enzyme in plants that is homologous to ERG27 in fungi and to HSD17B7 in vertebrates that makes this reduction in C-3 and the present study is already a great starting material for future research aimed at the search by such an enzyme.

**Key words:** *Maytenus*; terpenes; friedelin; friedelan-3-ol; transcriptome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estruturas do sesquiterpeno diidro- $\beta$ -agarofurano (1), do triterpeno quinonametídeo (2) e dos derivados friedelânicos, exemplificados por friedelan-3-ol (3) e friedelina (4).....	22
<b>Figura 2</b> – Distribuição geográfica de <i>Maytenus ilicifolia</i> . ....	23
<b>Figura 3</b> – Biossíntese de terpenos (via do mevalonato).....	25
<b>Figura 4</b> – Rearranjos dos carbocátions precursores dos terpenos pentacíclicos.....	27
<b>Figura 5</b> – Esqueleto básico dos triterpenos friedelan-3-ol (1) e friedelina (2). ....	28
<b>Figura 6</b> – Formação do enol a partir da abstração do próton (vermelho) e, conseqüentemente, formação de friedelina e seu epímero, 4-epifriedelina, o qual não foi observado.....	29
<b>Figura 7</b> – Proposta de formação da friedelina pelo rearranjo Wagner-Meerwein 1,2 do próton (vermelho) e abstração do próton (azul), inicialmente doado pelo sítio enzimático ao 2,3-oxidoesqualeno dando início às ciclizações.....	30
<b>Figura 8</b> – Estrutura química básica dos esteroides. ....	31
<b>Figura 9</b> – Esteroides de fungos, vertebrados e plantas.....	31
<b>Figura 10</b> – Representação esquemática do complexo de dupla desmetilação em C-4 nos fungos.....	32
<b>Figura 11</b> – Esquema representativo da reação BP (transcrito + pDONR207) para formação do clone de entrada. ....	46
<b>Figura 12</b> – Esquema representativo da reação LR (clone de entrada + vetor de destino) para formação do vetor de expressão.....	48
<b>Figura 13</b> – Cromatogramas obtidos por meio de CG-EM para cada uma das amostras vegetais (análise preliminar). ....	56
<b>Figura 14</b> – Massas das frações coletadas no fracionamento do extrato da folha de <i>M. ilicifolia</i> . ....	57
<b>Figura 15</b> – Cromatograma obtido para o precipitado da subfração FR3.5.....	58
<b>Figura 16</b> – Espectro de massas experimental do friedelan-3-ol. ....	58
<b>Figura 17</b> – Espectro de massas experimental da friedelina. ....	59
<b>Figura 18</b> – Esqueleto básico das moléculas de friedelina e friedelan-3-ol.....	59
<b>Figura 19</b> – Espectro DEPTQ da fração FR3.5. ....	60
<b>Figura 20</b> – Alinhamento dos transcritos 45855 com a enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (17 $\beta$ -HSD) e SDRs correspondentes de cada isoforma. ....	66
<b>Figura 21</b> – Alinhamento dos transcritos 52338 com a enzima 3-ceto redutase e SDR correspondente.....	67
<b>Figura 22</b> – Espectro no UV do RNA extraído. ....	67
<b>Figura 23</b> – Eletroferograma da RNA extraído. ....	68

<b>Figura 24</b> – Gel de eletroforese contendo o padrão de tamanhos no 1º poço e o cDNA sintetizado no 2º poço.....	68
<b>Figura 25</b> – Mapa dos pares de primers na sequência de DN45855. ....	69
<b>Figura 26</b> – Mapa dos pares de primers na sequência de DN52338. ....	69
<b>Figura 27</b> – Produtos de PCR de cada grupo de isoformas (DN45855 e DN52338) obtidos utilizando pares de primers F2 e R2 pré-desenhados para confirmação dos transcritos de interesse. ....	70
<b>Figura 28</b> – Produtos de PCR de cada grupo de isoformas (DN45855 e DN52338) obtidos utilizando os primers com sequência recombinante (attB) pré-desenhados para clonagem dos transcritos via Gateway. ....	71
<b>Figura 29</b> – Transcritos purificados 45855_i6, 52338_i6 e 52338_i1 sintetizados por PCR com primer attB.....	72
<b>Figura 30</b> – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pDONR207+45855_i6 com a enzima de restrição <i>Bgl</i> II.....	73
<b>Figura 31</b> – Fragmentos gerados pela digestão dos vetores pDONR207+52338_i1 e pDONR207+52338_i6 com a enzima de restrição <i>Hpa</i> I.....	74
<b>Figura 32</b> – Esquema representativo da primeira etapa de clonagem (reação BP) dos três transcritos e suas colônias resultantes. As destacadas em vermelho foram as selecionadas para a próxima etapa (reação LR). ....	75
<b>Figura 33</b> – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pAG423GAL+45855_i6 com a enzima de restrição <i>Sac</i> I.....	75
<b>Figura 34</b> – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pAG423GAL+52338_i1 com a enzima de restrição <i>Mlu</i> I.....	76
<b>Figura 35</b> – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pAG423GAL+52338_i6 com a enzima de restrição <i>Cla</i> I. ....	76
<b>Figura 36</b> – Esquema representativo da segunda etapa de clonagem (reação LR) dos três transcritos (45855_i6, 52338_i1 e 52338_i6, respectivamente) e suas colônias resultantes. As destacadas em vermelho foram as selecionadas para o sequenciamento.....	77
<b>Figura 37</b> – Esquema representativo das colônias de cada transcrito selecionadas para o sequenciamento e aquelas que se alinham com a sequência teórica. ....	78
<b>Figura 38</b> – PCR de colônia de <i>Mi</i> FRS, 45855_i6, 52338_i1 e 52338_i6. ....	79
<b>Figura 39</b> – Cromatogramas dos pellets obtidos na extração dos plasmídeos vazios e dos contendo os transcritos em comparação com o padrão. ....	80
<b>Figura 40</b> – Cromatogramas dos meios de cultura obtidos na extração dos plasmídeos vazios e dos contendo os transcritos em comparação com o padrão.....	80
<b>Figura 41</b> – Espectros de massas da friedelina produzida pelo gene <i>Mi</i> FRS e do padrão. .	81
<b>Figura 42</b> – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente às frações FR1. Fase móvel: Hex/AcOEt 98:02.....	91
<b>Figura 43</b> – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente às frações FR2. Fase móvel: Hex/AcOEt 95:05.....	91

<b>Figura 44</b> – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente às frações FR3. Fase móvel: Hex/AcOEt 90:10.....	91
<b>Figura 45</b> – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente aos precipitados das frações FR3. Fase móvel: Hex/AcOEt 90:10.....	92
<b>Figura 46</b> – Alinhamento múltiplo e design dos pares de primers para os transcritos 45855. ....	96
<b>Figura 47</b> – Alinhamento múltiplo e design dos pares de primers para os transcritos 52338. ....	98
<b>Figura 48</b> – Alinhamento da sequência obtida por bioinformática do transcrito 45855_i6 (branco) com as sequências obtidas para cada primer M13F (azul), M13R (verde) e PM (laranja) nas reações de sequenciamento.....	100
<b>Figura 49</b> – Alinhamento da sequência obtida por bioinformática do transcrito 52338_i1 (branco) com as sequências obtidas para cada primer M13F (azul) e M13R (verde) nas reações de sequenciamento. ....	101
<b>Figura 50</b> – Alinhamento da sequência obtida por bioinformática do transcrito 52338_i6 (branco) com as sequências obtidas para cada primer M13F (azul) e M13R (verde) nas reações de sequenciamento. ....	102

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Método analítico para análise em CG-EM.....	40
<b>Tabela 2</b> – Frações e subfrações coletadas no fracionamento do extrato de <i>M. ilicifolia</i> por fracionamento em sílica. ....	41
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros utilizados no design de primers.....	44
<b>Tabela 4</b> – Mistura reacional da BP.....	46
<b>Tabela 5</b> – Protocolo da reação de digestão.....	47
<b>Tabela 6</b> – Mistura reacional da LR. ....	48
<b>Tabela 7</b> – Reação de sequenciamento .....	49
<b>Tabela 8</b> – Primers para sequenciamento. ....	49
<b>Tabela 9</b> – Programação do termociclador para reação de sequenciamento.....	50
<b>Tabela 10</b> – Mistura reacional adicionado ao pellet para transformação em levedura por choque térmico. ....	51
<b>Tabelas 11 e 12</b> – Reação de PCR de colônia e programação do termociclador. ....	53
<b>Tabela 13</b> – Primers utilizados na reação de PCR de colônia de cada transcrito e seus respectivos amplicons.....	53
<b>Tabela 14</b> – Dados de RMN <sup>13</sup> C obtido para a fração FR3.5 isolada em comparação com os dados da literatura (CDCl <sub>3</sub> , 125 MHz) para tal e para friedelina. Experimento realizado em clorofórmio deuterado (600 MHz).....	60
<b>Tabela 15</b> – Quantificação dos transcritos de <i>M. ilicifolia</i> que alinham com enzimas 3-ceto redutase.....	61
<b>Tabela 16</b> – Transcritos de <i>Q. suber</i> que alinham com enzimas 3-ceto redutase.....	62
<b>Tabela 17</b> – Transcritos de <i>M. ilicifolia</i> que se alinham com os 15 transcritos de <i>Q. suber</i> . ....	63
<b>Tabela 18</b> – Porcentagem de identidade entre os transcritos e as enzimas da biblioteca e as enzimas obtidas pelo <i>blastp</i> (taxid: 3193). ....	64
<b>Tabela 19</b> – Pares de <i>primers</i> para o grupo DN45855.....	69
<b>Tabela 20</b> – Pares de <i>primers</i> para o grupo DN52338.....	69
<b>Tabela 21</b> – Primers contendo sequências recombinantes ( <i>attB</i> ) para clonagem via Gateway. ....	71
<b>Tabela 22</b> – Amostras separadas em pellet e meio de cultura injetadas no CG-EM em triplicata. ....	79

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Nomes e códigos enzimáticos (E.C.) das enzimas referentes à cada etapa da rota biossintética de esteroides em fungos, vertebrados e plantas terrestres..... 33
- Quadro 2** – Etapas da rota biossintética dos esteroides e seus genes correspondentes em organismos modelo vegetais..... 33
- Quadro 3** – Espécies que contêm friedelina e friedelan-3-ol em sua composição química.. 82

# SUMÁRIO

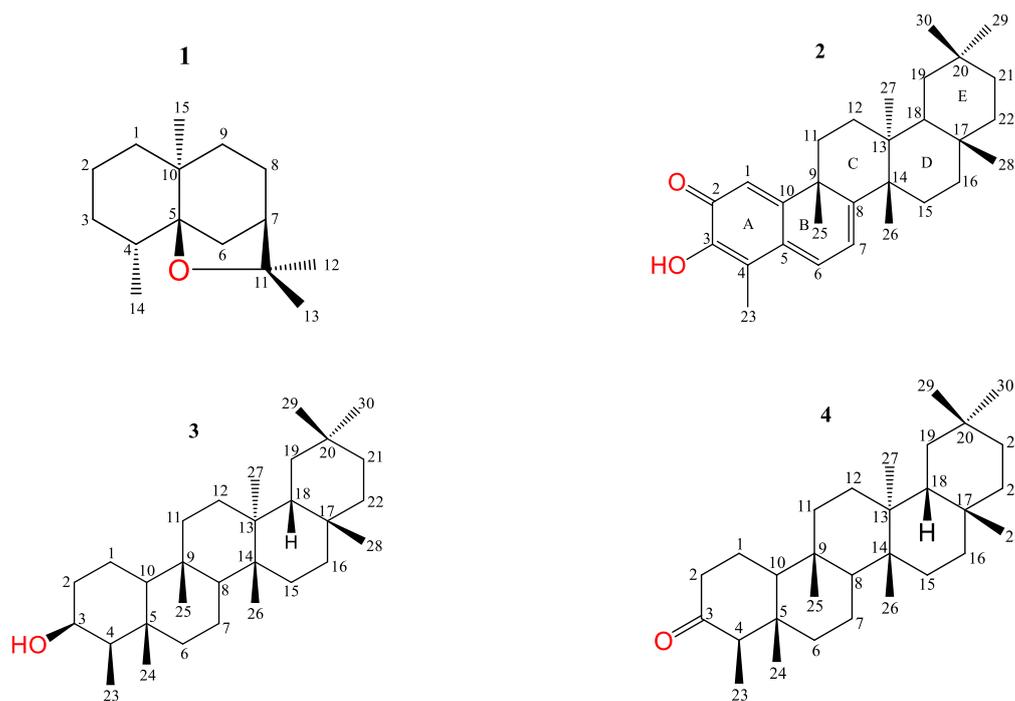
<b>1</b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>21</b>
<b>1.1</b>	<b>A FAMÍLIA CELASTRACEAE E O GÊNERO <i>MAYTENUS</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.2</b>	<b>TERPENOS</b> .....	<b>24</b>
1.2.1	TRITERPENOS: FRIEDELINA E FRIEDELAN-3-OL .....	25
<b>1.3</b>	<b>ENZIMAS 3-CETO REDUTASE</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4</b>	<b>ENGENHARIA METABÓLICA APLICANDO BIOLOGIA MOLECULAR E MICROBIOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
<b>2</b>	<b><u>OBJETIVO</u></b> .....	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIAIS</u></b> .....	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>EQUIPAMENTOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>REAGENTES, SOLVENTES, ADSORVENTES</b> .....	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>MEIOS DE CULTURA, SUPLEMENTOS E ANTIBIÓTICOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>KITS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>PLASMÍDEOS</b> .....	<b>38</b>
<b>3.6</b>	<b>LINHAGEM DE BACTÉRIA E LEVEDURA</b> .....	<b>38</b>
<b>3.7</b>	<b>MATERIAL VEGETAL</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b><u>MÉTODOS</u></b> .....	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>PARTE 1 – ANÁLISE QUÍMICA (IQ – UNESP ARARAQUARA)</b> .....	<b>40</b>
4.1.1	PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL, PREPARO DOS EXTRATOS E ANÁLISE POR CG-EM .....	40
4.1.2	ISOLAMENTO DO PADRÃO DE FRIEDELAN-3-OL.....	40
4.1.2.1	Fracionamento cromatográfico do extrato .....	41
<b>4.2</b>	<b>PARTE 2 – BIOLOGIA MOLECULAR E MICROBIOLOGIA (FCFAR – UNESP ARARAQUARA)</b> .....	<b>42</b>
4.2.1	ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE <i>M. ILICIFOLIA</i> POR BIOINFORMÁTICA.....	42
4.2.2	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS FOLHAS.....	43
4.2.3	SÍNTESE DA BIBLIOTECA DE CDNA POR RT-PCR.....	44
4.2.4	DESIGN DE PRIMERS E CONFIRMAÇÃO DOS TRANSCRITOS DN45855 E DN52338.....	44
4.2.5	DESIGN DE PRIMERS COM ATTB E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA PARA CLONAGEM VIA GATEWAY .....	45
4.2.6	CLONAGEM DOS TRANSCRITOS 45855_I6; 52338_I1 E 52338_I6.....	45
4.2.7	SEQUENCIAMENTO DOS TRANSCRITOS 45855_I6; 52338_I1 E 52338_I6.....	49
4.2.8	TRANSFORMAÇÃO DOS TRANSCRITOS EM LEVEDURA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	50
4.2.9	PCR DE COLÔNIA: CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DOS TRANSCRITOS EM LEVEDURA .....	52
4.2.10	INDUÇÃO DA EXPRESSÃO POR GALACTOSE .....	54
4.2.11	EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS E ANÁLISE POR GC-EM .....	54

<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>PARTE 1 – ANÁLISE QUÍMICA (IQ – UNESP ARARAQUARA) .....</b>	<b>56</b>
5.1.1	ANÁLISE PRELIMINAR DOS EXTRATOS DE BAIXA POLARIDADE DE <i>M. ILICIFOLIA</i> .....	56
5.1.2	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE FRIEDELAN-3-OL.....	57
5.1.2.1	Fracionamento cromatográfico do extrato .....	57
5.1.2.2	Padrão de friedelan-3-ol: análise e caracterização por CG-EM e RMN <sup>13</sup> C .....	57
<b>5.2</b>	<b>PARTE 2 – BIOLOGIA MOLECULAR E MICROBIOLOGIA (FCFAR – UNESP ARARAQUARA) .....</b>	<b>61</b>
5.2.1	ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE <i>M. ILICIFOLIA</i> POR BIOINFORMÁTICA.....	61
5.2.2	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS FOLHAS.....	67
5.2.3	SÍNTESE DA BIBLIOTECA DE CDNA POR RT-PCR.....	68
5.2.4	DESIGN DE PRIMERS E CONFIRMAÇÃO DOS TRANSCRITOS DN45855 E DN52338.....	69
5.2.5	DESIGN DE PRIMERS COM ATTB E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA PARA CLONAGEM VIA GATEWAY .....	70
5.2.6	CLONAGEM DOS TRANSCRITOS 45855_16; 52338_11 E 52338_16.....	72
5.2.7	SEQUENCIAMENTO DOS TRANSCRITOS 45855_16; 52338_11 E 52338_16.....	77
5.2.8	PCR DE COLÔNIA: TRANSCRITOS 45855_16, 52338_11 E 52338_16 E GENE <i>MiFRS</i> .....	78
5.2.9	ANÁLISE POR CG-EM DO EXTRATO DE LEVEDURA APÓS INDUÇÃO .....	79
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A família Celastraceae e o gênero *Maytenus*

Celastraceae, mais comumente conhecida como família agridoce devido ao sabor de seus frutos, é uma das famílias vegetais de angiospermas que compreende cerca de 96 gêneros e 1.350 espécies amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o norte da África, Américas Central e do Sul e leste da Ásia (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016). É uma família que contém várias espécies de árvores e arbustos amplamente utilizadas na agricultura como inseticida (SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014) e na medicina popular da Ásia e América Latina. Estudos químicos de espécies de Celastraceae indicam a ocorrência de uma diversidade de metabólitos secundários, proporcionando uma série de aplicações biológicas já relatadas, tais como, antitumoral, antipirética, antiinflamatória, contraceptiva, antimalaria, antiulcerogênica entre outras (GONZÁLEZ *et al.*, 2000). Os constituintes bioativos desta família que merecem destaque são os terpenos. Eles são uma classe de metabólitos secundários que apresentam grande diversidade estrutural sendo biossintetizados a partir de unidades de isopreno (C<sub>5</sub>), pirofosfato de isopentenila (IPP) e pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). Os característicos de Celastraceae são os sesquiterpenos diidro-β-agarofuranos (GAO *et al.*, 2007), os triterpenos quinonametídeos e os derivados friedelânicos (Figura 1) (GUNATILAKA, 1996), os quais também são reconhecidos como os marcadores quimiotaxonômicos da família.



**Figura 1** – Estruturas do sesquiterpeno diidro- $\beta$ -agarofurano (1), do triterpeno quinonamético (2) e dos derivados friedelânicos, exemplificados por friedelan-3-ol (3) e friedelina (4).

**Fonte:** (GAO *et al.*, 2007; GUNATILAKA, 1996).

Os principais gêneros desta família são *Maytenus* (200 espécies), *Euonymus* (200 espécies), *Salacia* (170 espécies) e *Hippocratea* (100 espécies) (JUDD *et al.*, 2002). *Maytenus*, um dos maiores gêneros de Celastraceae, compreende cerca de 225 espécies tropicais sendo 77 delas nativas do Brasil (SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014). Muitos relatos na medicina popular estão associados às espécies deste gênero devido ao uso de suas folhas, cascas e raízes no tratamento de úlceras gástricas, atuando, também, como analgésica e antiinflamatória (VELOSO *et al.*, 2017).

Dentre as espécies de *Maytenus*, se destaca a *Maytenus ilicifolia*, uma das espécies mais estudadas do gênero, sendo popularmente conhecida como espinheira-santa, cancorosa, espinheira-divina, erva-cancrosa, erva-santa. É uma árvore de 4-5 m de altura com tronco liso de 15-25 cm de diâmetro e com folhas coriáceas espinhentas podendo ser encontrada na América do Sul com destaque para Paraguai, Uruguai, Bolívia, leste da Argentina e Brasil, no qual está presente nos estados de São Paulo, Minas Gerais e, principalmente, nas regiões sul e centro-oeste (Figura 2) (BIRAL; LOMBARDI, 2020; LORENZI, 1998).



identificadas sendo estes responsáveis por diversas atividades biológicas, tais como os flavonoides com potencial antioxidante (PESSUTO *et al.*, 2009) e os triterpenos com atividades analgésica, anti-inflamatória, antipirética dentre outras (SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014). Apesar dos triterpenos também apresentarem atividade antiulcerogênica comprovada (GONZALEZ *et al.*, 2001), eles não são os responsáveis por esta atividade relatada na medicina popular desta espécie visto que se tratam de moléculas de baixa polaridade e que, portanto, não são extraídas por infusão (extrato aquoso) (FERREIRA *et al.*, 2004).

## 1.2 Terpenos

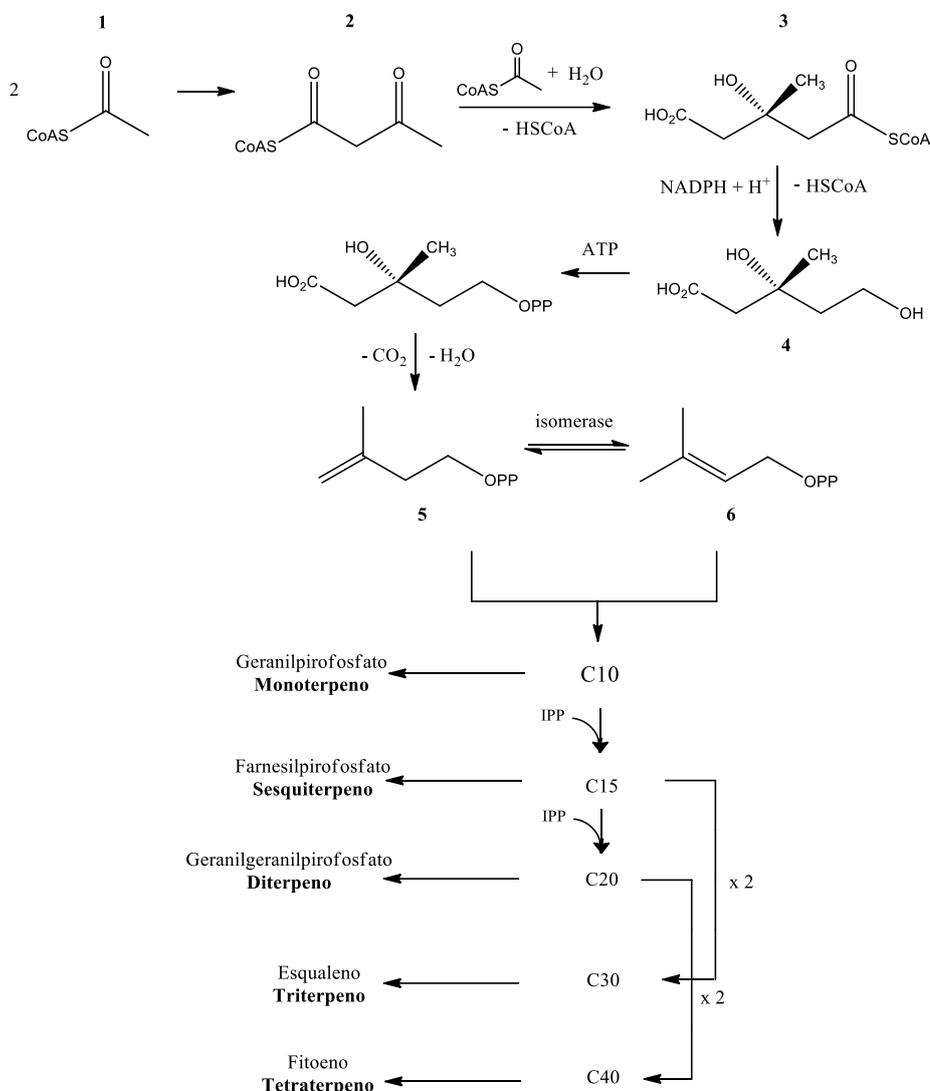
Os terpenos são uma ampla classe de produtos naturais que apresentam uma série de funções ecológicas e biológicas. Muitas plantas produzem terpenos voláteis que atuam principalmente na atração de insetos para polinização e outras que produzem terpenos tóxicos ou amargos que atuam na sua proteção (BREITMAIER, 2006). Além disso, do ponto de vista comercial, os produtos de extração ou destilação a vapor das substâncias desta classe podem ser utilizados como flavorizantes de alimentos e na criação de perfumes (BREITMAIER, 2006).

Mais de 30.000 terpenos já foram identificados e sua rota biossintética bem fundamentada, tanto a via do mevalonato (MEV) quanto a via do metileritritol (MEP). Esta classe de metabólitos, também chamada de isoprenoides, é formada pela via do mevalonato na qual seus blocos construtores são unidades de cinco carbonos, os isoprenos (C5), que são unidos por uma combinação “cabeça-cauda” (BREITMAIER, 2006; DEWICK, 2009).

A quantidade dessas unidades de cinco carbonos define várias subclasses de terpenos como os **hemiterpenos** (C5), **monoterpenos** (C10), **sesquiterpenos** (C15), **diterpenos** (C20), **sesterpenos** (C25), **triterpenos** (C30) e **tetraterpenos** (C40) (BREITMAIER, 2006; DEWICK, 2009).

O precursor biossintético dos terpenos é a acetil-coenzima A ou ácido acético ativado. Em uma condensação, dois equivalentes de acetil-CoA (**1**) reagem formando a acetoacetil-CoA (**2**) que, por sua vez, reage com outro equivalente de acetil-CoA formando o  $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -metilglutaril-CoA (**3**). Esta molécula sofre uma redução enzimática gerando o ácido mevalônico (**4**) que, por meio de uma fosforilação seguida de descarboxilação e desidratação, forma o pirofosfato de

isopentenila (IPP) (5). Tal molécula também pode isomerizar formando o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) (6). Estes dois isoprenos ativos reagem formando os monoterpenos que, por reações subseqüentes com o IPP, formam as outras subclasses de terpenos (Figura 3) (BREITMAIER, 2006; DEWICK, 2009).



**Figura 3** – Biossíntese de terpenos (via do mevalonato).

**Fonte:** adaptado de (BREITMAIER, 2006; DEWICK, 2009)

### 1.2.1 Triterpenos: friedelina e friedelan-3-ol

De todas as subclasses de terpenos, os que se destacam nas espécies de *Maytenus* são os triterpenos, mais especificamente, os pentacíclicos (SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014). Nas plantas, eles são formados a partir da ciclização do precursor, 2,3-oxidosqualeno, catalisada por enzimas oxidosqualeno

ciclase (OSC), comumente conhecidas como triterpeno sintase (KUSHIRO; EBIZUKA, 2010) (Figura 4).

Na maioria dos casos, os esqueletos dos triterpenos recém catalizados pelas enzimas OSCs sofrem uma série de modificações estruturais, tais como oxidações regio- e estereo-específicas, por meio da ação de enzimas oxidoredutases do tipo P450 levando à funcionalização do esqueleto com hidroxilas, carbonilas, carboxilas e epóxidos (BICALHO *et al.*, 2019; GHOSH, 2017).

Cada rearranjo representado na Figura 4 gera um cátion diferente que dará origem à terpenos tetra- e pentacíclicos característicos. O derivado com maior número de rearranjos é a friedelina, a qual é formada a partir do cátion friedelila e é o único triterpeno pentacíclico cetônico da rota (WANG *et al.*, 2010). Do ponto de vista sintético, a maioria das modificações estruturais ocorre no anel A devido à presença do grupo cetônio em C-3 sendo o único grupo funcionalmente ativo passível de transformações (DAS; SARKAR; GHOSH, 2018).

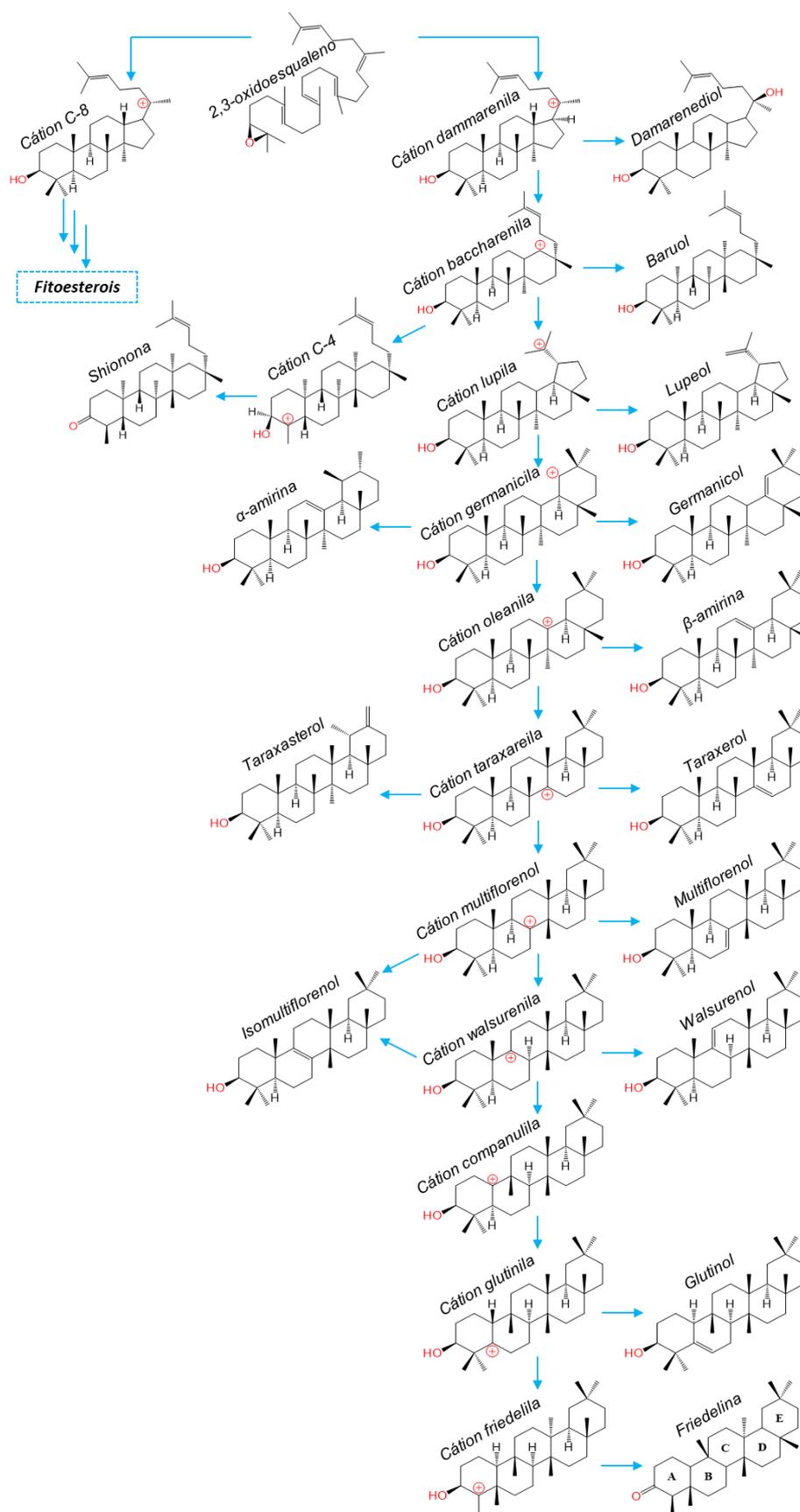
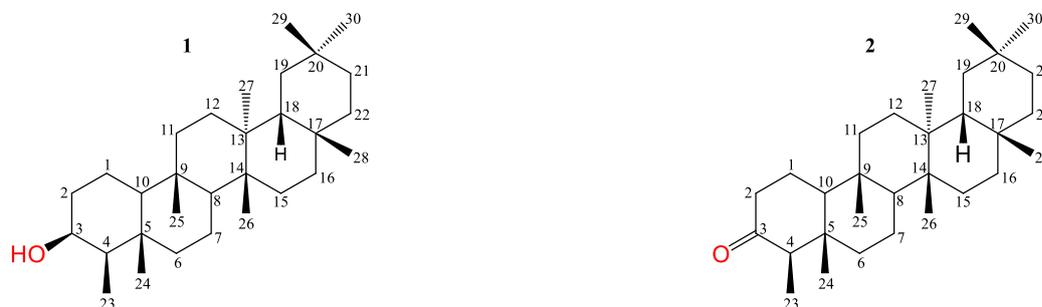


Figura 4 – Rearranjos dos carbocátions precursores dos terpenos pentacíclicos.

Fonte: adaptado de (HAN *et al.*, 2018; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2016).

Segundo Vilegas e colaboradores (VILEGAS; LANÇAS; CERVI, 1994), os triterpenos friedelan-3-ol (1) e friedelina (2) são as substâncias mais abundantes no extrato de baixa polaridade das folhas de *M. ilicifolia* (Figura 5).



**Figura 5** – Esqueleto básico dos triterpenos friedelan-3-ol (1) e friedelina (2).

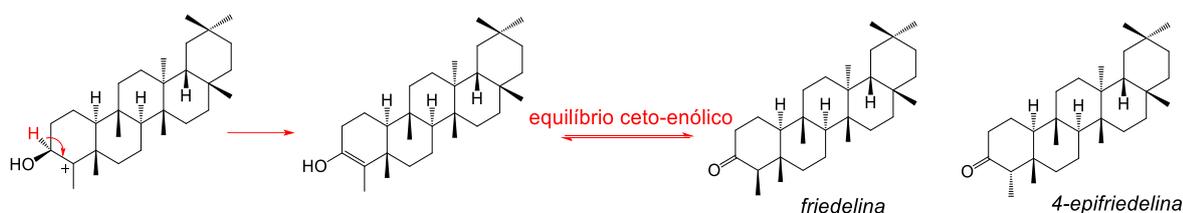
**Fonte:** elaborada pela autora.

A friedelina é uma substância de grande interesse terapêutico, pois além de ser precursora de substâncias com potencial antitumoral tais como os triterpenos quinonametídeos celastrol, maitenina e pristimerina (HERNANDES *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020), ela apresenta atividades biológicas intrínsecas atuando como anti-inflamatório, analgésico, antipirético (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), antimicrobiano (KUETE *et al.*, 2007), e gastroprotetor (ANTONISAMY *et al.*, 2015). Ela pertence à classe de triterpenoides do tipo friedelano, a qual contém mais de 400 substâncias já isoladas até o momento (DAS; SARKAR; GHOSH, 2018). Tal classe pode ser encontrada nas famílias Celastraceae, Hippocrateaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae e Guttiferae, sendo as duas primeiras famílias as fontes mais ricas (SHAN *et al.*, 2013).

Sua rota biossintética tem sido estudada e explorada no âmbito da biologia molecular e engenharia metabólica sobretudo em relação à enzima responsável pela sua formação, a friedelina sintase que apresenta função de ciclase (OSC) (ALVES *et al.*, 2018; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2016). Para caracterizar sua via metabólica e aumentar a sua produção, microorganismos geneticamente modificados foram utilizados evitando o extrativismo predatório, proporcionando o uso de uma fonte de produção renovável mais ágil que a planta e permitindo manipulação genética para ampliar seu rendimento e produção em escala ampliada (MOSER; PICHLER, 2019).

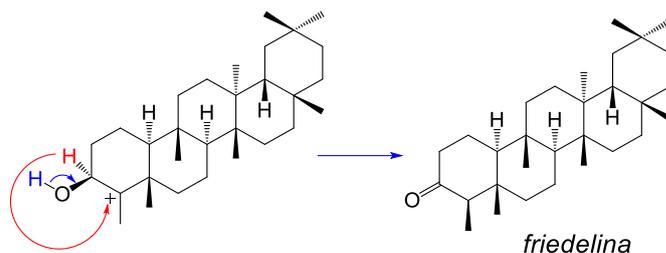
Sua biossíntese se inicia com a protonação do 2,3-oxidoesqualeno seguida de ciclizações subsequentes e rearranjos, finalizando com a desprotonação (Figura 4) (WANG *et al.*, 2010). Várias OSCs originadas de plantas foram clonadas e caracterizadas por expressão heteróloga em leveduras. Entretanto, somente alguns estudos incluem genes envolvidos na biossíntese de friedelina (HAN *et al.*, 2018). O primeiro relato deste tipo de gene (KdFRS) foi em *Kalanchoe daigremontiana* (WANG *et al.*, 2010), no qual, por meio de expressão heteróloga em leveduras foi possível observar que se trata de uma enzima multifuncional que produz pequenas quantidades de  $\beta$ -amirina e taraxerol juntamente com friedelina. Posteriormente, foi identificado o gene (*MiFRS*) em *Maytenus ilicifolia* (ALVES *et al.*, 2018; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2016) e em *Populus davidiana* (PdFRS) (HAN *et al.*, 2018) sendo que em ambos, a enzima OSC é monofuncional produzindo apenas friedelina.

Estudos mais antigos (CORSINO *et al.*, 2000) relatam que o friedelan-3-ol seria um precursor da friedelina já que foi observado formação de ambos durante a determinação da atividade enzimática da ciclase. Contudo, estudos recentes relacionados à triterpenos cetônicos na posição C-3, como a astertarona A, indicam que não há formação da forma enólica a partir do cátion na cavidade enzimática das OSC, já que se houvesse, seria observado quantidades significativas da forma epimérica deste triterpeno (Figura 6) (JIN *et al.*, 2018). Além disso, a biossíntese da friedelina se inicia com a protonação do 2,3-oxidoesqualeno seguida de ciclizações subsequentes e rearranjos, finalizando com a desprotonação (Figura 7) no sítio enzimático da friedelina sintase (WANG *et al.*, 2010). Tal enzima é monofuncional em *Maytenus ilicifolia* (*MiFRS*), e, portanto, estudos realizados por ALVES *et al.* (2018) e SOUZA-MOREIRA *et al.*, (2016) não relatam friedelan-3-ol como produto da reação enzimática. Dessa forma, acredita-se que outra enzima possa ser responsável pela formação de um triterpeno monoálcool (friedelan-3-ol) a partir de um triterpeno pentacíclico cetônico (friedelina).



**Figura 6** – Formação do enol a partir da abstração do próton (vermelho) e, conseqüentemente, formação de friedelina e seu epímero, 4-epifriedelina, o qual não foi observado.

Fonte: adaptado de (JIN *et al.*, 2018).



**Figura 7** – Proposta de formação da friedelina pelo rearranjo Wagner-Meerwein 1,2 do próton (vermelho) e abstração do próton (azul), inicialmente doado pelo sítio enzimático ao 2,3-oxidoesqualeno dando início às ciclizações.

Fonte: adaptado de (JIN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2010).

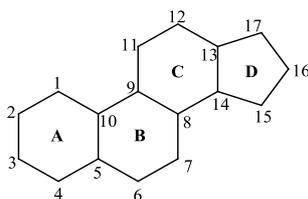
### 1.3 Enzimas 3-ceto redutase

Na natureza existem uma série de enzimas que são classificadas como oxidoreduases podendo atuar nas mais variadas funcionalizações presentes nas estruturas químicas. Dentre elas, destaca-se as que atuam no grupo de doadores =CH-OH com NAD<sup>+</sup> ou NAP<sup>+</sup> como aceptores. Somente dentro desta categoria, existem cerca de 400 enzimas (KEGG, 2022; MCDONALD; BOYCE; TIPTON, 2009; NC-IUBMB, 2010). Entretanto, uma delas merece destaque no presente trabalho visto que atua especificamente na redução de grupos ceto presentes na posição C-3. Elas são denominadas “3-ceto redutase” (E.C.: 1.1.1.270) e podem ser encontradas na rota biossintética dos esteróides, cuja estrutura química básica está representada na Figura 8 (KEGG, 2022).

Esteróides específicos são produzidos em diferentes organismos e sua rota biossintética tem sido bem elucidada em fungos, plantas terrestres e vertebrados. Além de compartilharem um ancestral comum na rota biossintética, o 2,3-oxidoesqualeno, também compartilham a maioria das etapas enzimáticas, as quais são realizadas por enzimas homólogas (DESMOND; GRIBALDO, 2009; UMATE, 2015).

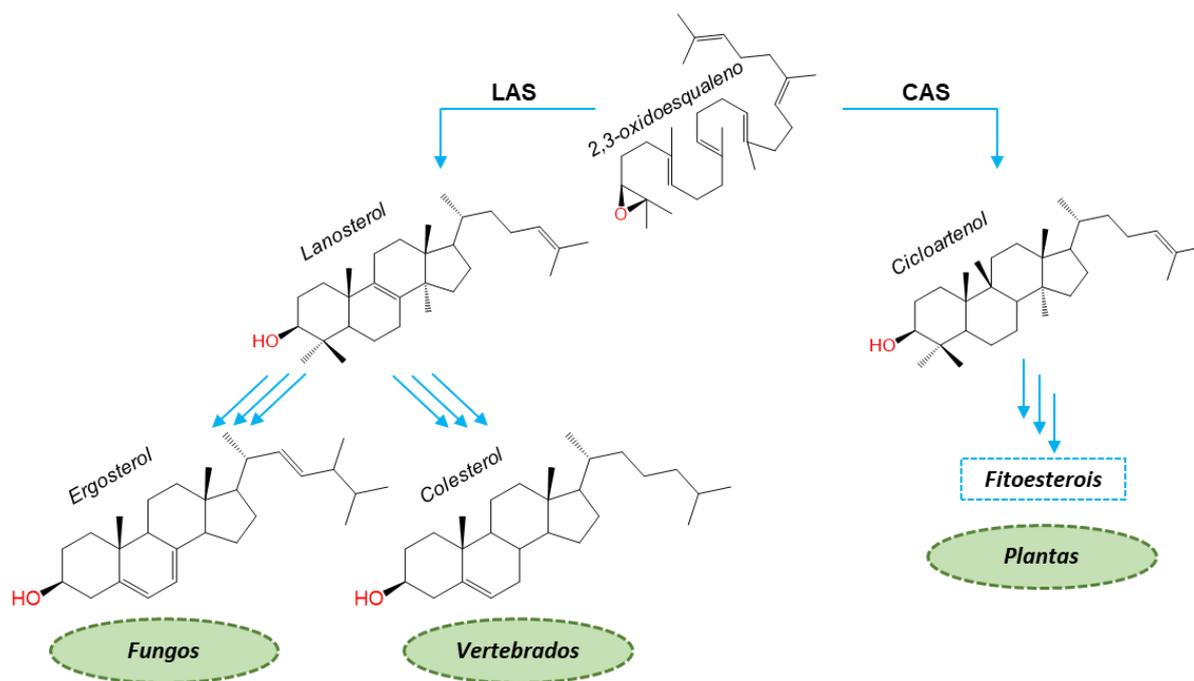
A ciclização do 2,3-oxidoesqualeno pode se dar de formas diferentes na biossíntese dos esteróides dependendo de qual enzima OSC está atuando. A lanosterol sintase (LAS) dá origem ao lanosterol, o primeiro intermediário tetracíclico em animais e fungos que é convertido em colesterol nos vertebrados e em ergosterol nos fungos. Já a cicloartenol sintase (CAS) sintetiza o cicloartenol, o

intermediário tetracíclico encontrado em plantas, o qual é convertido nos fitoesteróis; sitosterol, campesterol e stigmasterol (UMATE, 2015) (Figura 9).



**Figura 8** – Estrutura química básica dos esteroides.

**Fonte:** adaptado de (DESMOND; GRIBALDO, 2009).



**Figura 9** – Esteroides de fungos, vertebrados e plantas.

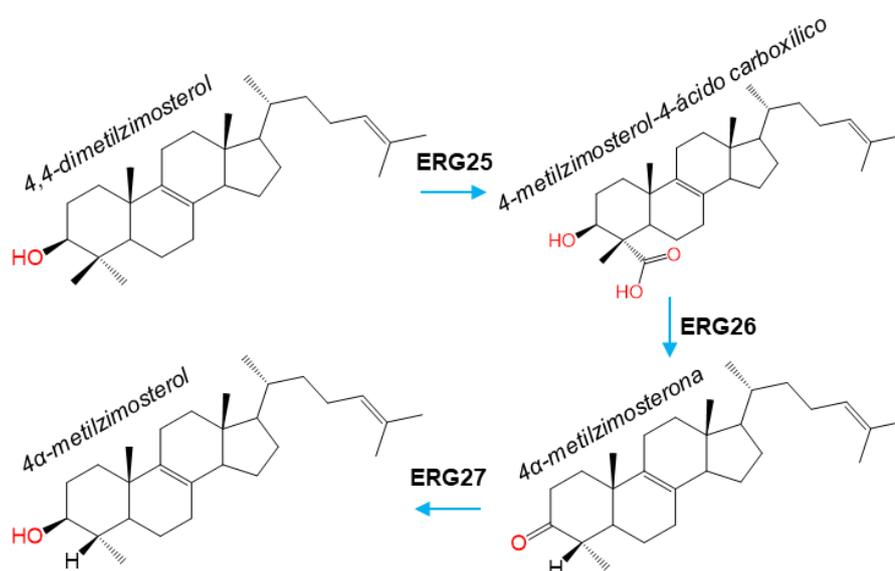
**Fonte:** adaptado de (DESMOND; GRIBALDO, 2009).

De uma maneira geral, a rota biossintética dos esteroides envolve 8 etapas principais:

- 1) Epoxidação do esqualeno seguida de ciclização (monooxigenação do esqualeno, ciclização do oxidoesqualeno)
- 2) Perda do grupo metila na posição C-14 (desmetilação em C-14, redução em C-14)
- 3) Perda dos grupos metila na posição C-4 (oxidação da metila na posição C-4, desidrogenação em C-3/descarboxilação em C-4, **cetoredução em C-3**)

- 4) Redução da ligação dupla  $\Delta$ -8 (isomerização  $\Delta$ -8,  $\Delta$ -7)
- 5) Formação da ligação dupla entre C-5 e C-6 (desaturação em C-5)
- 6) Adição dos grupos metila (metilação C-24 ou C-28)
- 7) Remoção das ligações duplas C7-8 e C24-25 (redução em  $\Delta$ -7 e  $\Delta$ -24)
- 8) Formação da ligação dupla entre C-22 e C-23 (desaturação em C-22)

O gene HSD17B7 é o responsável por codificar a enzima 3-ceto redutase na rota biossintética dos esteroides nos vertebrados e o gene ERG27 nos fungos. Eles atuam na terceira etapa da rota fazendo parte do complexo de dupla desmetilação em C-4 cuja representação pode ser vista na Figura 10.



**Figura 10** – Representação esquemática do complexo de dupla desmetilação em C-4 nos fungos.

**Fonte:** adaptado de (TARAMINO *et al.*, 2010).

As denominações acima das setas são referentes aos genes que codificam as três etapas de desmetilação em C-4 (oxidação da metila na posição C-4, desidrogenação em C-3/descarboxilação em C-4, cetoredução em C-3, respectivamente).

Entretanto, segundo Desmond e colaboradores (DESMOND; GRIBALDO, 2009; UMATE, 2015), ainda não foi identificado o homólogo da enzima 3-ceto redutase em plantas terrestres, ao passo que em fungos e vertebrados, já está bem estabelecida (Quadro 1 e 2).

**Quadro 1** – Nomes e códigos enzimáticos (E.C.) das enzimas referentes à cada etapa da rota biossintética de esteroides em fungos, vertebrados e plantas terrestres.

Steps	Fungi	Vertebrates	Land plants
Squalene monooxygenation	ERG1 (1.14.99.7)	SQLE (1.14.99.7)	SQE (1.14.99.7)
Oxydosqualene cyclization	ERG7 (5.4.99.7)	LSS (5.4.99.7)	CAS1 (5.4.99.8)
C-14 demethylation	ERG11 (1.14.13.70)	CYP51A1 (1.14.13.70)	CYP51G1 (1.14.13.70)
C-14 reduction	ERG24 (1.3.1.70)	TM7SF2 (1.3.1.70)	FK (1.3.1.70)
C-4 methyl oxidation	C-4 demethylation	ERG25 (1.14.13.72)	SMO1, SMO2
C-3 dehydrogenation/C-4 decarboxylation		ERG26 (1.1.1.170)	AT3BETAHSD (1.1.1.170)
C-3 ketoreduction		ERG27 (1.1.1.270)	HSD17B7 (1.1.1.270)
ER anchoring	ERG28	C14orf1	ERG28
Delta-8, delta-7 isomerization	ERG2	EBP (5.3.3.5)	HYD1 (5.3.3.5)
C-5 desaturation	ERG3	SC5DL (1.14.21.6)	STE1 (1.14.21.6)
C-24 methylation or C-28 methylation	ERG6 (2.1.1.41)		SMT1 (2.1.1.41), SMT2 (2.1.1.143)
Delta-7 reduction		DHCR7 (1.3.1.21)	DWF5 (1.3.1.21)
Delta-24 reduction	ERG4 (1.3.1.71)	DHCR24 (1.3.1.72)	DWF1 (1.3.1.72)
C-22 desaturation	ERG5		CYP710A1
Cyclopropylsterol isomerization			CPI1 (5.5.1.9)

**Fonte:** (DESMOND; GRIBALDO, 2009).

**Quadro 2** – Etapas da rota biossintética dos esteroides e seus genes correspondentes em organismos modelo vegetais.

Steps	<i>A. thaliana</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>O. sativa</i>	<i>P. patens</i>	<i>S. moellendorffii</i>
Squalene monooxygenation	SQE (6)	SQP (3)	SQP (2)	SQP (1)	SQP (1)
Δ-8, Δ-7 isomerization	HYD1 (1)	8,7 SI (2)	8,7 SI (1)	8,7 SI (1)	8,7 SI (1)
C-5 desaturation	STE1 (1)	STE1 (2)	STE1 (1)	STE1 (1)	STE1 (1)
Δ-24 reduction	DWF1 (1)	ST24R (2)*	ST24R (1)*	ST24R (2)*	ST24R (1)*
C-22 desaturation	CYP710A (4)	CYP710A (1)	CYP710A (4)	CYP710A (1)	CYP710A (1)
C-24 or C-28 methylation	SMT (3)	SMT (2)	SMT (3)	SMT (1)	SMT (1)
Oxydosqualene cyclization	CAS1 (1)	CAS (1)	CAS (10)	CAS (1)	CAS (1)
C-14 demethylation	CYP51 (1)	CYP51 (2)	CYP51 (7)	CYP51 (1)	CYP51 (1)
C-14 reduction	FK (1)	ST14R (1)	ST14R (2)	ST14R (1)	ST14R (1)
C-4 methyl oxidation	SMO (5)	SMO (2)	SMO (9)	SMO (2)	SMO (2)
C-3 dehydrogenation/C-4 decarboxylation	HSD (3)	HSD (1)	HSD (2)	HSD (1)	HSD (1)
C-3 ketoreduction	Not found	Not found	Not found	Not found	Not found
Endoplasmic reticulum anchoring	ERG28 (1)	ERG28 (1)	EBP28 (1)	ERG28 (1)	ERG28 (1)
Δ-7 reduction	DWF5 (1)	ST7R (2)*	ST7R (1)*	ST7R (1)*	ST7R (1)*
Cyclopropyl sterol isomerization	CPI (1)	CPI (1)*	CPI (1)*	CPI (1)*	CPI (1)*

\* Identified using *A. thaliana* protein sequence as query

**Fonte:** (UMATE, 2015).

Dessa forma, baseado na abordagem filogenômica, (UMATE, 2015) propôs um gene para esta enzima, o “succinato-semialdeído desidrogenase [NAD(P)+]”. Contudo, não foi encontrado qualquer similaridade na sequência entre o gene ERG27 e o candidato acima de *Arabidopsis thaliana* (erva-estrelada) e *Oryza sativa* (arroz). Frente a isso, conclui-se que deve existir um gene desconhecido, similar ao ERG27 e HSD17B7, que codifica a enzima 3-ceto redutase na rota biossintética dos terpenos em plantas terrestres, já que tanto o ERG27/HSD17B7 quanto o gene de interesse apresentam mesma função enzimática, a redução no carbono C-3.

#### 1.4 Engenharia metabólica aplicando biologia molecular e microbiologia

A busca e a descoberta de tal enzima seriam extremamente relevantes na área de biossíntese de produtos naturais visto que contribuiria na determinação de várias rotas biossintéticas de plantas que apresentam em sua composição terpenos cetônicos na posição C-3 e seus derivados reduzidos.

O uso da biologia molecular, assim como o transcriptoma, permite tal conquista e tem se mostrado muito eficiente na busca de novas enzimas. Por se tratar de um conjunto de genes expressos na célula, ele depende do estado específico de desenvolvimento do ser vivo e da sua fisiologia, ou seja, um indivíduo adulto transcreve genes diferentes que um indivíduo jovem assim como quando são comparadas as células das folhas com as células das raízes (GUO *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2022).

Com o auxílio de microorganismos geneticamente modificados, é possível expressar esses genes em sistema heterólogo permitindo a transposição de uma rota biossintética de uma planta para um microorganismo. Entre os sistemas mais utilizados em engenharia genética, encontra-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Ela é vantajosa por ser um eucarioto unicelular de rápido crescimento, fácil manipulação e por possuir maquinaria biossintética necessária para processamento das proteínas de organismos eucariotos como as plantas (GOMES *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2008; LUO *et al.*, 2015; MOSES *et al.*, 2013).

Neste contexto, o presente trabalho visa identificar e caracterizar uma enzima do tipo redutase capaz de reduzir um grupo cetônico na posição C-3 de terpenos em seus derivados alcoólicos utilizando ferramentas da biologia molecular e microbiologia. Independentemente de os produtos da reação enzimática serem bioativos (gastroprotetores) (MOSSI *et al.*, 2004), o foco deste trabalho é diferenciado. Considerando que até então não há relatos de sua existência, a busca por novas enzimas, mais especificamente a 3-ceto redutase de plantas, permite contribuir com o estudo biossintético de espécies vegetais impactando de maneira positiva no entendimento de seu metabolismo e servindo como base para estudos futuros com diferentes aplicabilidades.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo principal é determinar o gene que codifica a enzima responsável pela redução do grupo cetônico na posição C-3 da friedelina em álcool levando ao friedelan-3-ol, ambas substâncias presentes no extrato de baixa polaridade das folhas de *Maytenus ilicifolia* e a clonagem e expressão dos genes em *S. cerevisiae*.

\*Esses estudos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microorganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, sob supervisão do Prof. Dr. Cleslei F. Zanelli.

### 2.1 Objetivos específicos

- Analisar o transcriptoma por meio da extração do RNA das folhas de *Maytenus ilicifolia* e montagem *De Novo*.
- Sintetizar o cDNA com oligonucleotídeos iniciadores por meio de PCR.
- Avaliar a presença de transcritos específicos às enzimas 3-ceto redutase.
- Clonagem e expressão funcional dos cDNA selecionados em *S. cerevisiae* utilizando vetor de expressão adequado por meio da tecnologia Gateway.
- Analisar os produtos terpênicos gerado após a expressão da enzima em levedura por CG-EM.

### 3 MATERIAIS

#### 3.1 Equipamentos

- Balança analítica Mettler Toledo<sup>®</sup>, modelo AB204-S (máx. 210 g; d = 0,1 mg);
- Banho de ultrassom Elmasonic<sup>®</sup>, modelo S 60H;
- Moinho analítico Ika Labortechnik<sup>®</sup>, modelo A11 Basic;
- Rotaevaporador r 144, Büchi<sup>®</sup>;
- Microfiltro de 0,22 µm Milipore<sup>®</sup>;
- pHmetro Beckman Coulter<sup>®</sup>, modelo PHi 510;
- Pipetas automáticas de 2, 10, 100, 200 e 1000 µL, Gilson<sup>®</sup>;
- Sistema de purificação de água Millipore Mili-Q<sup>®</sup>;
- Vortex Mixer, Fisher Scientific<sup>®</sup>;
- NMR 600 MHz Bruker Avance III HD 600 equipado com as probes BBO 600Mz S3 5mm com Z-gradiente e uma Crioprobe com 4 canais com controle de temperatura. O equipamento possui trocador automático de amostras, automação quanto aos procedimentos de lock, sintonia dos núcleos e shimming; Software *TopSpin 3.2*, Bruker<sup>®</sup>;
- Sequenciador ABI3130, Applied Biosystems<sup>®</sup>;
- Bioanalyzer, Agilent<sup>®</sup> 2100;
- Cromatógrafo a gás Shimadzu<sup>®</sup> QP-2020 equipado com injetor automático modelo AOC-20i e acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu (GC-MS), com coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), controlado por software *GCMS solutions Ver. 4.41*;
- Incubator Shaker a 37°C New Brunswick Scientific<sup>®</sup>, Innova 4430;
- Incubator Shaker a 30°C New Brunswick Scientific<sup>®</sup>, Innova 4000;
- Estufa de Cultura Fanem Ltda<sup>®</sup>, modelo 002 CB a 37°C;
- Câmara de Incubação B.O.D. a 30°C Fanem<sup>®</sup>, modelo 347CD;
- MicroPulser Eletroporador, Bio-Rad Laboratories<sup>®</sup>;
- Autoclave Vertical CS, Primatec<sup>®</sup>;
- Centrífuga de bancada 5415D, Eppendorf<sup>®</sup>;
- Espectrofotômetro NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>;
- Espectrofotômetro DU 800, Beckman Coulter<sup>®</sup>;

- Cuba de Eletroforese Horizontal Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>, modelo Owl Easycast B2;
- Gibco BRL Electrophoresis Power Supply Life Technologies<sup>®</sup>, modelo 250;
- Termociclador Biometra<sup>®</sup> TAdvanced;
- Fluxo laminar, Veco<sup>®</sup>;
- Banho de Aquecimento Fanem<sup>®</sup>, modelo 1100;
- Chapa de Aquecimento a 96°C, Lab-Line<sup>®</sup>;
- Agitador Multiplataformas Kasvi<sup>®</sup>, modelo K40-10208;
- Agitador Magnético com Aquecimento Thermolyne<sup>®</sup>, modelo Cimarec 2;
- Câmara UV para documentação do gel, Syngene<sup>®</sup>.

### 3.2 Reagentes, solventes, adsorventes

- Água ultrapura Mili-Q<sup>®</sup>;
- Hexano grau cromatográfico, Honeywell Riedel-de Haën<sup>®</sup>;
- Acetato de Etila grau cromatográfico, Vetec Química Fina<sup>®</sup>;
- Silica Gel, poro 60Å, 70-230 mesh, 63-200 µm, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;
- Placas CCD Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, Merk<sup>®</sup>;
- Revelador anisaldeído;
- Agarose BioReagent, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

### 3.3 Meios de cultura, suplementos e antibióticos

- LB Difco<sup>®</sup> LB Broth, Miller (Luria-Bertani), BD Biosciences<sup>®</sup>;
- YPD
  - Extrato de Levedura, Kasvi<sup>®</sup>;
  - Bacto Peptona, BD Biosciences<sup>®</sup>;
- SC
  - *Dropout media*, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;
  - Difco Yeast Nitrogen Base (YNB) w/o Amino Acids, BD Biosciences<sup>®</sup>;
- Agar Bacteriológico, Kasvi<sup>®</sup>;
- Ampicilina, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;
- Gentamicina, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;
- Cloranfenicol, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>;

- D-(+)-Glicose, Sigma-Aldrich®;
- D-(+)-Galactose, Sigma-Aldrich®;
- D-Sorbitol 98%, Sigma-Aldrich®;
- D-Rafinose, Gold Biotechnology®.

### 3.4 Kits

- RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen®;
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription, Thermo Fisher Scientific®;
- GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Fisher Scientific®;
- PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific®;
- Gateway BP Clonase II, Thermo Fisher Scientific®;
- Gateway LR Clonase II, Thermo Fisher Scientific®.

### 3.5 Plasmídeos

- pDONR207-ccdb;
- pAG423GAL-ccdb;
- pESC-URA-*MiFRS*Opt.

### 3.6 Linhagem de bactéria e levedura

- Bactéria competente *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ;
- Levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada KB13 com quatro marcas auxotróficas: ura, his, trp, leu e *knock out* do gene PAH1.

### 3.7 Material vegetal

Os indivíduos jovens de *Maytenus ilicifolia* foram adquiridos em Ribeirão Preto (21° 11' 56,1" S; 47° 46' 42,2" W). A identificação botânica foi realizada pela Prof. Rita Maria de Carvalho-Okano e o voucher 00755 foi depositado no Herbário do Departamento de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto (HPM-UNAERP). As folhas do espécime adulto foram coletadas no Horto Florestal de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara (21° 48' 53,5" S; 48° 11' 59,8" W) e identificadas pelo botânico Prof. Dr. Julio A. Lombardi, do Herbário Rioclarense (UNESP – Rio Claro) sob o código HRCB

68663. A espécie *Maytenus ilicifolia* está cadastrada sob código nº A733117 no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 PARTE 1 – Análise Química (IQ – UNESP Araraquara)

#### 4.1.1 Processamento do material vegetal, preparo dos extratos e análise por CG-EM

Depois de realizadas a coleta, as folhas foram trituradas na presença de nitrogênio líquido em gral e pistilo para que seu metabolismo não fosse alterado. Ao material vegetal pulverizado foram adicionados volume correspondente de Hex/AcOEt 7:3 seguindo a proporção 1:10 m/V. A amostra foi submetida à três extrações consecutivas com auxílio de ultrassom utilizando mesmo volume de solvente extrator em cada etapa. Após a secagem em temperatura ambiente, os extratos foram filtrados em filtros de 0,22 µm para posterior injeção no CG-EM, seguindo metodologia analítica de Corsino (CORSINO, 2001) (Tabela 1). Tal análise teve como finalidade verificar a produção de friedelina e friedelan-3-ol pela planta para posterior extração do RNA total. Para o isolamento do padrão foi feita uma extração de mesmo procedimento, mas em escala maior com folhas do indivíduo adulto.

**Tabela 1** – Método analítico para análise em CG-EM.

<b>Equipamento</b>	GCMS-QP2020 Shimadzu
<b>Software</b>	GCMSolutions Ver. 4.41
<b>Coluna</b>	Rtx-5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm
<b>Programação da temperatura</b>	180 °C (2 min) subindo à uma taxa de 5°C/min até 280 °C (23 min)
<b>Tempo de análise</b>	45 min
<b>Temperatura do injetor</b>	270 °C
<b>Gás de arraste</b>	Hélio
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min
<b>Fonte de ionização</b>	Impacto de elétrons
<b>Temperatura da fonte</b>	270 °C
<b>Temperatura da interface</b>	280 °C
<b>Faixa da massa de aquisição</b>	35-700 Da

**Fonte:** adaptado de (CORSINO, 2001).

#### 4.1.2 Isolamento do padrão de friedelan-3-ol

Como serão realizadas análises por CG-EM após expressão heteróloga em *S. cerevisiae*, o isolamento de padrões se faz necessário para avaliação dos produtos produzidos pela levedura. O padrão de friedelina já havia sido isolado sendo apenas necessário o isolamento do padrão de friedelan-3-ol.

#### 4.1.2.1 Fracionamento cromatográfico do extrato

Para fracionar o extrato bruto utilizou-se uma coluna de vidro aberta a qual foi empacotada úmida na proporção do primeiro eluente, Hex/AcOEt 8:2 e sílica com tamanho de partícula de 63-200  $\mu\text{m}$  (70-230 mesh) e com poros de 60 Å, resultando em uma altura útil de 22 cm e de um volume morto de 20 mL.

Cerca de 600 mg de extrato dispersos em sílica foram aplicados no topo da coluna seguido da eluição de 6 grandes frações com volume de solvente igual a 3x o volume morto (60 mL) da coluna.

Alguns estudos que relatam o isolamento destes padrões sugerem a eluição utilizando a proporção de 98:02 (QUEIROGA *et al.*, 2000) e outros de 95:05 de Hex/AcOEt (ANTONISAMY; DURAIANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011). Como as duas substâncias, friedelina e friedelan-3-ol, são muito semelhantes estruturalmente entre si e não apresentam grupos cromóforos em suas estruturas químicas, foi determinada a eluição de ambas as frações 98:02 e 95:05, além de subdividir as frações FR1, FR2 e FR3 em 10 subfrações de 6 mL cada na tentativa de separar as substâncias e já isolar o padrão purificado. Já as frações FR4 e FR5 foram subdivididas em 4 subfrações de 15 mL cada e a FR6 (100% AcOEt) foi a última a ser eluída para limpeza da coluna, como exemplificado na Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2** – Frações e subfrações coletadas no fracionamento do extrato de *M. ilicifolia* por fracionamento em sílica.

Fração	Eluição	Subfrações
FR1	Hex/AcOEt 98:02	FR1.1 a FR1.10
FR2	Hex/AcOEt 95:05	FR2.1 a FR2.10
FR3	Hex/AcOEt 90:10	FR3.1 a FR3.10
FR4	Hex/AcOEt 85:15	FR4.1 a FR4.4
FR5	Hex/AcOEt 80:20	FR5.1 a FR5.4

**Fonte:** elaborada pela autora.

As 30 subfrações de interesse (FR1, FR2 e FR3) foram secas em temperatura ambiente e sujeitas à análise por Cromatografia em Camada Delgada com revelação por anisaldeído (ANEXO A). A subfração 3.5 foi submetida às análises por CG-EM e Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$ .

## 4.2 PARTE 2 – Biologia Molecular e Microbiologia (FCFar – UNESP Araraquara)

### 4.2.1 Análise do transcriptoma de *M. ilicifolia* por bioinformática

Em estudos anteriores do grupo foram realizados dois sequenciamentos das folhas de *M. ilicifolia* e dois sequenciamentos das raízes da mesma espécie (BICALHO *et al.*, 2019; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2016). Esses dados foram submetidos à análise de qualidade das *reads* (FastQC), trimagem (*Trimmomatic*) e montagem do transcriptoma (*De Novo Assembly*) pelo software Galaxy (SANTONI *et al.*, 2021). Todo o procedimento de análise dos dados foi baseado na publicação de Devi e colaboradores (DEVI *et al.*, 2016). Os dados brutos dos transcritos foram filtrados por meio do *Trimmomatic* no qual foram removidos os adaptadores, as *reads* com qualidade média < 25 (Phred +33), as *reads* com tamanho < 50 bp e as bases nitrogenadas do início e fim da *read* com qualidade < 25 (DEVI *et al.*, 2016; SANTONI *et al.*, 2021).

Sequencialmente, foi feita a montagem *De Novo* do transcriptoma e a quantificação pelo software Salmon. Tendo em vista que são dados múltiplos de RNA-Seq, ou seja, de indivíduos e tecidos diferentes, foram gerados dois arquivos do tipo FASTA, um contendo as *reads forward* e outro, as *reads reverse* das folhas e raízes. Dessa forma, foi gerada uma única montagem a qual irá servir de base na quantificação dos transcritos para cada indivíduo e tecido (HAAS, 2020; HAAS *et al.*, 2013).

Na quantificação da abundância dos transcritos, as *reads* das duas folhas e duas raízes foram alinhadas ao arquivo de montagem completo obtido na etapa anterior com a finalidade de se obter o número de *reads* que foram necessárias para gerar cada transcrito e, conseqüentemente, se obter o índice TPM (Transcritos Por Milhão). O TPM é um método de normalização em RNA-Seq que se trata do mapeamento de *reads* por transcrito dividido pelo tamanho do transcrito, podendo ser lida como “número de cópias de um determinado transcrito que existiria em uma coleção de 1 milhão de transcritos” (HSIEH; OYANG; CHEN, 2018; PATRO *et al.*, 2017).

Paralelamente, foi feito um levantamento e produção de uma biblioteca contendo todas as enzimas sob o nome “3-ceto redutase” presentes na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Após quantificação, foi feito o

alinhamento de cada transcrito com as enzimas da biblioteca por meio da ferramenta “blastx”, a qual consiste na busca de proteínas através de uma sequência de nucleotídeos traduzida.

Dos transcritos resultantes deste alinhamento, foi feito um mapeamento frente à rota biossintética dos esteroides, mais precisamente, à enzima 3-ceto redutase codificada pelos genes ERG27 e HSD17B7 (Enzyme Commission – EC 1.1.1.270) por meio do software BLAST2GO e da plataforma KEGG.

Associado ao procedimento anterior, a mesma busca foi feita para os transcritos de *Quercus suber* (nome popular: cortiça) cuja composição química é rica em friedelan-3-ol e friedelina (AROSO *et al.*, 2017). Os transcritos de *Q. suber* foram encontrados na plataforma NCBI sob o *accession number* ERP001762 (PEREIRA-LEAL *et al.*, 2014) e, da mesma forma que foi feito para os transcritos de *M. ilicifolia*, eles foram alinhados e mapeados com o auxílio do software BLAST2GO e da plataforma KEGG.

Posteriormente, os transcritos alinhados e mapeados de *M. ilicifolia* e os transcritos alinhados e mapeados de *Q. suber* foram alinhados entre si. Tal busca teve a finalidade de restringir ainda mais os transcritos de interesse, já que os de *M. ilicifolia* que se alinham com os de *Q. suber* podem estar relacionados com a mesma via metabólica em ambas as espécies tendo como principal suposição, a conversão da friedelina em friedelan-3-ol, já que ambas produzem tais metabólitos.

### 4.2.2 Extração do RNA total das folhas

Paralelamente ao estudo de bioinformática, foram realizadas extrações do RNA total das folhas de *M. ilicifolia* utilizando o kit *RNeasy Plant Mini Kit* da Qiagen® cujo protocolo se encontra no ANEXO B.

A análise quantitativa do RNA extraído foi realizada em espectrofotômetro *NanoDrop* da Thermo Scientific® o qual além de fornecer a concentração do RNA, também calcula as razões 260/230 e 260/280. Tendo em vista que todos os nucleotídeos absorvem em 260 nm, as proteínas e fenol em 280 nm e EDTA, carboidratos em 230 nm, as razões supracitadas nada mais são do que indícios da pureza do RNA extraído. Dessa forma, um RNA livre de contaminantes deve apresentar razões próximas a 2 (SCIENTIFIC, 2019a).

A análise qualitativa do RNA extraído foi realizada no *Bioanalyzer* da Agilent Technologies® o qual se baseia em uma eletroforese capilar. O resultado da qualidade e integridade do RNA é fornecido por meio de um eletroferograma contendo duas bandas de absorção referentes às unidades ribossomais 18S e 28S (KUSCHEL; AUSSERER, 2000).

#### 4.2.3 Síntese da biblioteca de cDNA por RT-PCR

O RNA extraído foi tratado com DNase I para remover qualquer DNA genômico que possa estar presente e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* cujo protocolo se encontra no ANEXO B. O cDNA sintetizado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### 4.2.4 Design de primers e confirmação dos transcritos DN45855 e DN52338

Com base nas informações obtidas nos alinhamentos dos transcritos em comum às duas espécies (ANEXO C), primers foram desenhados a partir de regiões conservadas dos mesmos com a finalidade de buscar os mais promissores na amostra de cDNA das folhas de *M. ilicifolia*.

O software Primer 3 Plus (BIOINFORMATICS, 2020) foi utilizado no desenho dos primers respeitando os seguintes parâmetros (Tabela 3):

**Tabela 3** – Parâmetros utilizados no design de primers.

<b>Tamanho do primer</b>	18-30 nucleotídeos
<b>Conteúdo GC%</b>	50-60%
<b>Melting Temperature (Tm)</b>	57-63°C
<b>Tm entre os pares de primers</b>	5°C
<b>Tamanho do amplicon</b>	150-700 pares de base

**Fonte:** elaborada pela autora.

Os *primers* desenhados foram empregados em reações de PCR utilizando o protocolo do fabricante da enzima *Taq DNA Polimerase* (Thermo Fisher®) para confirmação dos transcritos de interesse. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### 4.2.5 Design de primers com attB e amplificação do cDNA para clonagem via Gateway

Após confirmação dos transcritos, novos primers contendo sequências recombinantes (*attB*) foram desenhados para o processo de clonagem via Gateway®.

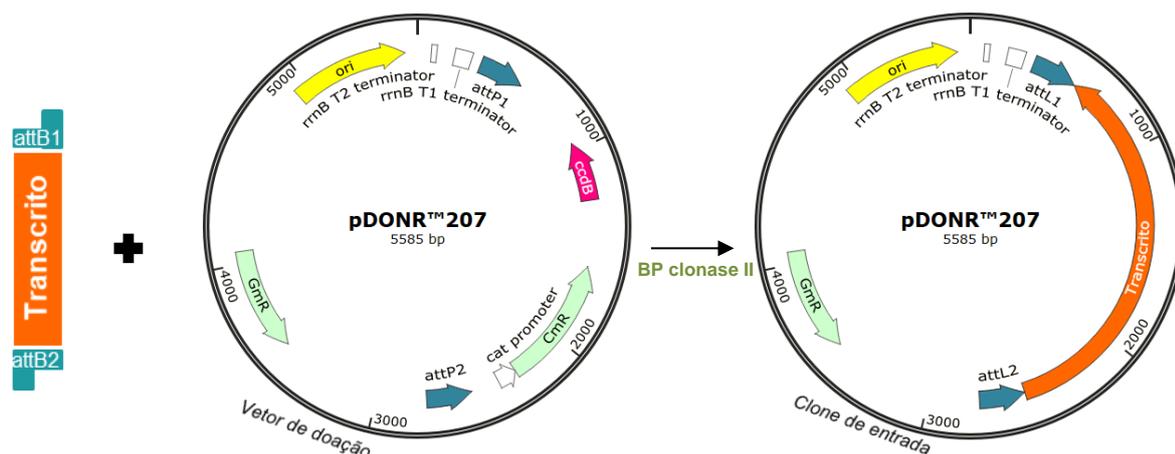
Para desenhar os primers adequados para clonagem Gateway®, foram incorporados 4 bases guanidina (G) no início da sequência 5', seguida do primer *attB* e de 1 ou 2 nucleotídeos adicionais, dependendo da orientação *reverse* ou *forward*, respectivamente, para corrigir a fase de leitura. Adicionalmente, cerca de 20 pares de base do transcrito também foram incorporadas no desenho do primer (Tabela 21 em Resultados e Discussão).

Os primers desenhados foram empregados em reações de PCR utilizando os protocolos do fabricante das enzimas *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Thermo Fisher®) e *AccuPrime Pfx DNA Polimerase* (Thermo Fisher®) para amplificação dos transcritos de interesse. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%, purificado por meio do protocolo *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher®) e quantificado em *NanoDrop* (Thermo Fisher®).

#### 4.2.6 Clonagem dos transcritos 45855\_i6; 52338\_i1 e 52338\_i6

A clonagem via Gateway® se dá pela recombinação  $\lambda$  que ocorre nos sítios específicos chamados “*site-specific attachment (att) sites*” os quais servem como sítios de ligação para proteínas recombinantes que irão auxiliar no *crossover* das sequências. Esse sistema de recombinação facilita a transferência de sequências heterólogas de DNA, flanqueadas com sítios *att* modificados, entre vetores por meio de duas reações: *reação BP* e *reação LR*, sem o uso de enzimas de restrição e de ligação comumente empregadas na clonagem clássica (INVITROGEN, 2012).

**Reação BP:** recombinação de um substrato *attB* (*attB*-transcrito) com um substrato *attP* (vetor de doação – pDONR207) catalisada pela enzima BP clonase II para criação do clone de entrada flanqueado com *attL* (híbrido de *attB* e *attP*) (Figura 11) (INVITROGEN, 2012).



**Figura 11** – Esquema representativo da reação BP (transcrito + pDONR207) para formação do clone de entrada.

**Fonte:** adaptado de (INVITROGEN, 2012).

Nesta primeira etapa, foram utilizadas quantidades equimolares de pDONR207/*attB*-transcrito que, de acordo com o protocolo do fabricante, 50 fmol seria a quantidade ideal para alta eficiência da reação (INVITROGEN, 2012). Para determinar quantos nanogramas de vetor e transcritos representam 50 fmol, foi utilizada a fórmula (1) abaixo para conversão:

$$ng = (fmol) * (N) * \frac{660 fg}{fmol} * \frac{1 ng}{10^6 fg} \quad (1)$$

Onde N é o tamanho do transcritos ou vetor em pares de base (pb).

Sabendo-se a quantidade necessária em nanogramas de transcritos e vetor (plasmídeo), foi possível calcular os volumes correspondentes por meio das concentrações obtidas na etapa de purificação dos mesmos, como será visto detalhadamente na sessão Resultados e Discussão. Todos os plasmídeos mencionados no presente relatório foram purificados seguindo protocolo do *PureLink Quick Plasmid Miniprep kit* (Thermo Fisher®).

A Tabela 4 abaixo resume cada componente e seu respectivo volume para a primeira reação de clonagem (BP) totalizando 10 µL de volume reacional.

**Tabela 4** – Mistura reacional da BP.

Componente	Concentração (45855_i6)	Volume (45855_i6)	Concentração (52338_i6)	Volume (52338_i6)	Concentração (52338_i1)	Volume (52338_i1)
Transcrito (50 fmol)	5,4 ng/µL	5,79 µL	5,2 ng/µL	4,6 µL	29,6 ng/µL	0,81 µL
pDONR207 (50 fmol)	132 ng/µL	1,39 µL	161,3 ng/µL	1,14 µL	163,3 ng/µL	1,12 µL
Tampão TE, pH 8,0	-	0,82 µL	-	2,26 µL	-	6,07 µL
Enzima BP Clonase II	-	2 µL	-	2 µL	-	2 µL

**Fonte:** (INVITROGEN, 2012).

A reação foi incubada a 25°C por 18 horas (*overnight*). Posteriormente, foi adicionado 1 µL de Proteinase K e incubada a 37°C por 10 minutos para terminar a reação. A mistura reacional resultante foi transformada em *E. coli* e os clones de entrada foram selecionados através do meio de cultura seletivo para ele (LB + gentamicina) com incubação em estufa a 37°C por 16 horas (INVITROGEN, 2012). Tanto o pDONR quanto o pAG423GAL-ccdB utilizado na reação LR, apresentam uma marca de resistência aos antibióticos gentamicina e ampicilina, respectivamente. Portanto, as colônias de *E. coli* que cresceram em meio seletivo, são as que incorporaram os plasmídeos mencionados.

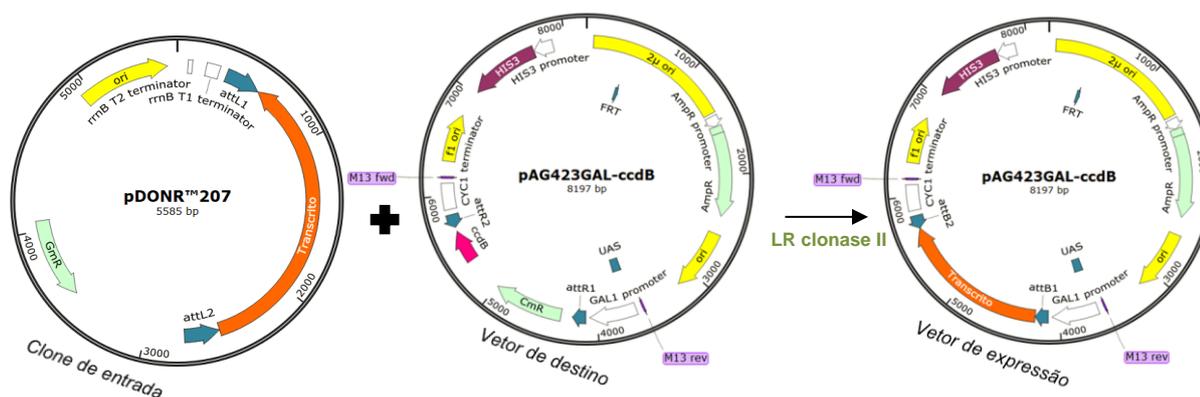
Algumas colônias resultantes foram selecionadas e inoculadas em LB líquido + gentamicina em *shaker* a 37°C por 16 horas e o pDONOR+transcrito extraído de cada uma foi digerido com as enzimas de restrição *BglII* (Thermo Fisher®) para o transcrito 45855\_i6 e *HpaI* (New England BioLabs®) para os transcritos 52338\_i1 e 52338\_i6, segundo protocolo resumido na Tabela 5, para verificar se a clonagem foi eficiente. Uma das colônias positivas de cada transcrito foi escolhida aleatoriamente para prosseguir pra próxima etapa, a reação LR.

**Tabela 5** – Protocolo da reação de digestão.

Componente	Volume
pDONR207+transcrito (200 ng)	Variável
Enzima de restrição	0,5 µL
Tampão	1,0 µL
Água	Para 10 µL
*mistura reacional com enzima Thermo Fisher incubada a 37°C por 45 min*	
*mistura reacional com enzima NEB incubada a 37°C por 60 min*	

**Fonte:** adaptado de (NEW ENGLAND BIOLABS, 2022; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

**Reação LR:** recombinação de um substrato *attL* (clone de entrada) com um substrato *attR* (vetor de destino – pAG423GAL-ccdB) catalisada pela enzima LR clonase II para criação do vetor de expressão flanqueado com *attB* (híbrido de *attL* e *attR*) (Figura 12) (INVITROGEN, 2012).



**Figura 12** – Esquema representativo da reação LR (clone de entrada + vetor de destino) para formação do vetor de expressão.

**Fonte:** adaptado de (INVITROGEN, 2012).

Nesta segunda reação, foram utilizadas 150 ng tanto do clone de entrada obtido na reação BP quanto do vetor de destino (pAG423GAL-ccdB), como representado na Tabela 6 abaixo.

**Tabela 6** – Mistura reacional da LR.

Componente	Concentração (45855_i6)	Volume (45855_i6)	Concentração (52338_i6)	Volume (52338_i6)	Concentração (52338_i1)	Volume (52338_i1)
Clone de entrada (150 ng)	38,5 ng/μL	3,9 μL	142,5 ng/μL	1,1 μL	378,3 ng/μL	0,39 μL
pAG423GAL-ccdB (150 ng)	38,5 ng/μL	3,9 μL	508,0 ng/μL	0,29 μL	498,3 ng/μL	0,30 μL
Tampão TE, pH 8,0	-	0,2 μL	-	6,61 μL	-	7,31 μL
Enzima LR Clonase II	-	2 μL	-	2 μL	-	2 μL

**Fonte:** (INVITROGEN, 2012).

Da mesma forma que na BP, a reação foi incubada a 25°C por 18 horas (*overnight*). Posteriormente, foi adicionado 1 μL de Proteinase K e incubada a 37°C por 10 minutos para terminar a reação. A mistura reacional resultante foi transformada em *E. coli* e os vetores de expressão foram selecionados através do meio de cultura seletivo para ele (LB + ampicilina) com incubação em estufa a 37°C por 16 horas (INVITROGEN, 2012).

Algumas colônias resultantes foram inoculadas em LB líquido + ampicilina em *shaker* a 37°C por 16 horas e o pAG423GAL+transcrito extraído de cada uma foi digerido com as enzimas de restrição *SacI* (Thermo Fisher®) para o transcrito 45855\_i6, *Clal* (New England BioLabs®) para o 52338\_i6 e *MluI* (New England BioLabs®) para o 52338\_i1, seguindo mesmo protocolo da Tabela 5, para verificar se a clonagem foi eficiente. Das selecionadas, as colônias 1 e 3 (45855\_i6), 2 e 3 (52338\_i6) e 1 a 4 (52338\_i1) foram sequenciadas.

## 4.2.7 Sequenciamento dos transcritos 45855\_i6; 52338\_i1 e 52338\_i6

Para garantir a qualidade da sequência a ser obtida, as amostras de DNA foram purificadas. Dessa forma, os plasmídeos pAG423GAL contendo o transcrito clonado foram extraídos das colônias selecionadas, previamente inoculadas em LB + ampicilina e incorporados na reação de sequenciamento descrita na Tabela 7 abaixo:

Tabela 7 – Reação de sequenciamento

Componente	Volume
Big Dye Mix	1,0 µL
Tampão de Sequenciamento	3,5 µL
Primer (1,6 µM)	2,0 µL
Amostra de DNA (500 ng)	Variável
Água	Para 20 µL

Fonte: protocolo do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares.

Como o transcrito 45855\_i6 é maior, foram realizadas 3 reações de sequenciamento cada uma contendo três primers diferentes: M13F, M13R e PM cujas informações se encontram na Tabela 8 a seguir. Para os 52338\_i6 e 52338\_i1 foram utilizados apenas o M13F e o M13R.

Tabela 8 – Primers para sequenciamento.

Primer	Sequência (5'-3')	Tm (°C)	%GC
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	57,6	50%
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	50,7	47%
PM	ATTCTTACAGGGGCATC	48,5	47%

Fonte: elaborada pela autora.

Os primers M13F (*forward*) e M13R (*reverse*) já apresentam sítios de ligação incorporados no plasmídeo pAG123GAL, como pode ser observado na Figura 12 e foram utilizados para sequenciar o fim e o início da sequência, respectivamente. Já o primer PM foi desenhado com base no próprio transcrito 45855 para sequenciar sua região central, uma vez que a janela de sequenciamento tanto do M13F quanto do M13R não alcançou as bases centrais do transcrito.

As misturas reacionais preparadas foram submetidas à seguinte programação no termociclador (Tabela 9):

**Tabela 9** – Programação do termociclador para reação de sequenciamento.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1x	96	1 min
	96	10 s
25x	T <sub>m</sub> do primer	5 s
	60	4 min
1x	60	5 min
1x	4	∞

**Fonte:** protocolo do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares.

Para finalizar o preparo das amostras, foram adicionados 10 µL de resina para retirar possíveis impurezas da mistura reacional e 45 µL de tampão SAM. As amostras foram agitadas por 30 min e aplicados no sequenciador.

#### 4.2.8 Transformação dos transcritos em levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Após análise das sequências obtidas para cada transcrito e suas respectivas colônias, foram selecionadas aquelas que apresentaram elevada identidade entre as sequências teóricas, obtidas inicialmente por bioinformática, e as experimentais para transformação em levedura geneticamente modificada.

No estudo realizado por Bicalho e colaboradores (BICALHO *et al.*, 2019), várias linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram geradas por modificações genéticas mediadas por CRISPR/Cas9. Dentre elas, se encontra a linhagem KB13 a qual contém 4 marcas auxotróficas (triptofano, histidina, leucina e uracila) podendo ser transformados até 4 plasmídeos de marcas diferentes.

Uma vez que a friedelina é produto da enzima friedelina sintase cujo substrato é o 2,3-oxidoesqualeno, a mesma seria utilizada como substrato para as possíveis enzimas codificadas pelos transcritos em estudo cujo produto seria o friedelan-3-ol. Dessa forma, para avaliar a função dessas enzimas em sistema heterólogo, dois plasmídeos com marcas auxotróficas diferentes foram transformados em KB13: um contendo o gene da friedelina sintase de *M. ilicifolia* (MIFRS) e outro contendo o transcrito em questão (45855\_i6 / 52338\_i1 / 52338\_i6), no qual o primeiro fornecerá o substrato para o segundo. Esta abordagem foi a mesma utilizada na determinação da enzima oxidoreductase CYP712K4 cuja função é catalisar a oxidação de friedelina a ácido maitenoico, intermediário da rota biossintética dos triterpenos quinonametídeos (BICALHO *et al.*, 2019).

Primeiramente, a linhagem KB13 foi plaqueada em meio YPD a 30°C e o plasmídeo pESC-URA-tHMG1-*MiFRS*, contendo o gene da friedelina sintase clonado anteriormente por (BICALHO *et al.*, 2019), foi purificado. Este gene é uma versão da isoforma 4 uma vez que determinaram sua maior produção de friedelina frente às outras isoformas (ALVES *et al.*, 2018).

O método de transformação empregado foi o de alta eficiência por choque térmico, também conhecido por “método acetato de lítio/SS-DNA carreador/polietilenoglicol” (GIETZ; SCHIESTL, 2007).

Inicialmente, a levedura KB13 foi inoculada em 5 mL de YPD a 30°C overnight sob agitação. A densidade óptica (DO) das células foi determinada na manhã seguinte e um volume referente à uma DO de 0,25 foi centrifugado a 3000 xg por 5 min, ressuspensionado em 10 mL de YPD e submetido à agitação por 4 horas a 30°C até atingir uma DO de 0,6. Após incubação, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 xg por 5 min, lavadas com 5 mL de água Milli-Q estéril e novamente coletadas por centrifugação. O pellet resultante foi ressuspensionado em 1 mL de 100mM LiAc (acetato de lítio) estéril e incubado por 15 min a 30°C sob agitação. Após centrifugação, foi adicionada a seguinte mistura ao pellet (Tabela 10):

**Tabela 10** – Mistura reacional adicionado ao pellet para transformação em levedura por choque térmico.

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
50% PEG	480 µL
1M LiAc	72 µL
SS-DNA (2mg/mL)	100 µL
Plasmídeo (400 ng)	D µL
Água Milli-Q	68-D µL

**Fonte:** adaptado de (GIETZ; SCHIESTL, 2007).

O pellet totalmente ressuspensionado na mistura reacional acima foi incubado a 30°C por 30 min sob agitação. Posteriormente, as células foram submetidas ao choque térmico a 42°C por 20 min e coletadas por centrifugação. Em seguida, elas foram ressuspensionadas em 200 µL de água Milli-Q estéril e plaqueadas em meio seletivo SC-URA, para seleção das colônias contendo o plasmídeo pESC-URA-tHMG1-*MiFRS* transformado. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias ou até o aparecimento de colônias.

O mesmo procedimento foi realizado para a transformação seguinte na qual uma colônia resultante da primeira transformação (KB13 + pESC-URA-tHMG1-M/FRS) foi submetida ao mesmo protocolo para transformação do segundo plasmídeo contendo um dos transcritos clonados previamente (pAG423GAL-45855\_i6 ou pAG423GAL-52338\_i1 ou pAG423GAL-52338\_i6). A única diferença é que a colônia inicial de KB13 + pESC-URA-tHMG1-M/FRS foi cultivada em SC-URA e não YPD e o plaqueamento final foi realizado em meio seletivo SC-URA-HIS para seleção das colônias KB13 + pESC-URA-tHMG1-M/FRS + pAG423GAL-transcrito.

Para controle negativo, foi transformado o plasmídeo pAG423GAL vazio em KB13 já contendo o pESC-URA vazio por meio da transformação por choque elétrico.

Da mesma forma que o protocolo anterior, foi feito inóculo em 5 mL de meio apropriado (SC-URA) a 30°C sob agitação overnight. A DO foi determinada e um volume de células correspondente à um DO de 0,25 foi centrifugado e ressuspendido em 25 mL de meio apropriado. Após atingir DO de 0,6 em uma incubação de 4-6h, as células foram coletadas por centrifugação a 1000 g por 5 min e ressuspendidas com 8 mL de sorbitol 1M. Foram adicionados 1mL de tampão TE 10x (pH 7,5) e 1 mL de LiAc 1M. A mistura foi incubada a 30°C por 30 min sob agitação, 100 µL de ditiontreitol (DTT) 1M foram adicionados e, novamente, incubada a 30°C por 15 min sob agitação. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 4°C, lavadas com 10 mL de sorbitol 1M refrigerado e ressuspendidas em 150 µL do mesmo. Aos 50 µL aliquoteados foram adicionados 1000 ng de plasmídeo (pAG423GAL) e a mistura foi deixada em repouso no gelo por 15 min. Posteriormente, ela foi transferida para um cubeta de eletroporação refrigerada e estéril e submetida à uma voltagem de 1500 V. Imediatamente depois, a mistura foi adicionada à 1 mL de sorbitol 1M e incubada a 30°C sob agitação por 2h. As células foram coletadas por centrifugação, ressuspendidas em 100 µL de água Milli-Q estéril e plaqueadas em meio seletivo (SC-URA-HIS). A incubação a 30°C durou 4 dias ou até o aparecimento de colônias.

#### 4.2.9 PCR de colônia: confirmação da transformação dos transcritos em levedura

As transformações dos transcritos foram confirmadas por PCR de colônia reproduzindo o protocolo da enzima *GoTaq G2 DNA Polymerase (colorless)*

(Promega®). Para isso, uma colônia de KB13 + *MiFRS* e quatro colônias de KB13 + *MiFRS* + pAG45855\_i6 e KB13 + *MiFRS* + pAG52338\_i1 foram selecionadas aleatoriamente em pontos diversos da placa. Já para a KB13 + *MiFRS* + pAG52338\_i6, apenas uma colônia foi submetida à PCR visto que foi a único presente na placa de cultivo.

Primeiramente, foram adicionados 10 µL de NaOH 20 mM em cada tubo de PCR para cada colônia. Em seguida, uma pequena quantidade de cada colônia foi transferida para seu respectivo tubo e incubadas no termociclador por 10 min a 95°C. Depois, foram centrifugadas por 1 min e 1 µL do sobrenadante foi coletado para PCR descrita nas Tabelas 11 e 12 abaixo:

**Tabelas 11 e 12** – Reação de PCR de colônia e programação do termociclador.

Componentes	Volume	Ciclos	Temp.	tempo
Tampão 5x colorless	4 µL	Desnaturação inicial	95°C	3 min
dNTP	0,4 µL	Desnaturação	95°C	30 s
Primer forward 5 µM	1,6 µL	Anelamento	50°C	30 s
Primer reverse 5 µM	1,6 µL	Extensão	72°C	3 min e 30 s
DNA (colônia)	1 µL	Extensão final	72°C	10 min
Enzima GoTaq	0,1 µL			
Água	11,3 µL			

**Fonte:** protocolo GoTaq G2 DNA Polymerase (PROMEGA, 2018).

Os primers utilizados para amplificação dos transcritos 45855\_i6, 52338\_i1 e 52338\_i6 estão descritos na Tabela 13 abaixo:

**Tabela 13** – Primers utilizados na reação de PCR de colônia de cada transcrito e seus respectivos amplicons.

Transcrito	Primer	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)
<i>MiFRS</i>	Forw.	GGGTCGAAGATCCAAACGGTG	1208
	Rev.	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCAAGCACTGTTTATCTTCATAGCC	
45855_i6	Forw.	CTCGGCTTGGCTATGTTACTG	410
	Rev.	GCTCGTCAAAGCAATAGAGAGG	
52338_i1	Forw.	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTTTGTTTTGGAAGGAAGG	796
	Rev.	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACTTTTTTCCCGAGGC	
52338_i6	Forw.	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGTTTCTTTTTGGAAGGAAGAG	796
	Rev.	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACTTTTTTCCCGAGGC	

**Fonte:** elaborada pela autora e (BICALHO *et al.*, 2019).

Os amplicons descritos na Tabela 13 acima foram verificados em eletroforese em gel de agarose 0,8%.

#### 4.2.10 Indução da expressão por galactose

As leveduras transformadas foram cultivadas overnight em 5 mL de meio apropriado (SC-URA para KB13 + pESC-URA-tHMG1-MFRS e SC-URA-HIS para KB13 + pESC-URA-tHMG1-MFRS + pAG-transcrito) a 30°C e sob agitação. As leveduras transformadas com os plasmídeos vazios também foram cultivadas para obtenção do controle negativo.

Posteriormente, os inóculos foram diluídos à mesma DO de 0,25 e cultivados em 10 mL de meio por 6h a 30°C em triplicata até atingir uma DO de 0,6. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min, lavadas com 1 mL de água Milli-Q estéril e centrifugadas novamente. Para indução da expressão, o pellet foi ressuspenso em 10 mL de SC-URA ou SC-URA-HIS suplementado com rafinose a 2% ao invés de glicose 2%, uma vez que a glicose inibe a indução por galactose (O'CONNOR, 2021). As culturas foram incubadas a 30°C sob agitação overnight e 500 µL de metil-β-ciclodextrina (MβCD) 5 mM foram adicionados em cada cultivo. Sua estrutura molecular permite que metabólitos de baixa polaridade sejam extraídos e concentrados no meio de cultura e não no pellet. A incubação se prolongou por mais 2 dias sob agitação constante a 30°C (BICALHO *et al.*, 2019).

#### 4.2.11 Extração dos metabólitos e análise por GC-EM

Após a indução, o meio de cultura foi separado do pellet por centrifugação e dois procedimentos de extração diferentes foram empregados para cada um.

- Extração do meio de cultura

Cerca de 5 mL de Hex/AcOEt 7:3 foram adicionados aos 10 mL de meio, vortexados e centrifugados por 5 min a 4000 rpm. A fase orgânica superior foi transferida para um frasco de vidro e o procedimento descrito foi repetido por mais 2 vezes. Os 15 mL de fase orgânica, contendo os metabólitos de interesse, foram evaporados e ressuspenso em 250 µL do mesmo solvente para análise por GC-EM descrita na Tabela 1.

- Extração do pellet

Os pellets foram lavados com água Milli-Q. A eles foi adicionado 1 mL de Hex/AcOEt 7:3, submetidos à agitação no vortex e deixados na bancada por 1 h. Em seguida, foram centrifugados e o sobrenadante transferido para outro frasco. Após secagem, foram ressuspensos em 250 µL do mesmo solvente para análise por CG-EM descrita na Tabela 1.

O padrão de friedelina e friedelan-3-ol isolado inicialmente também foi injetado no mesmo método.

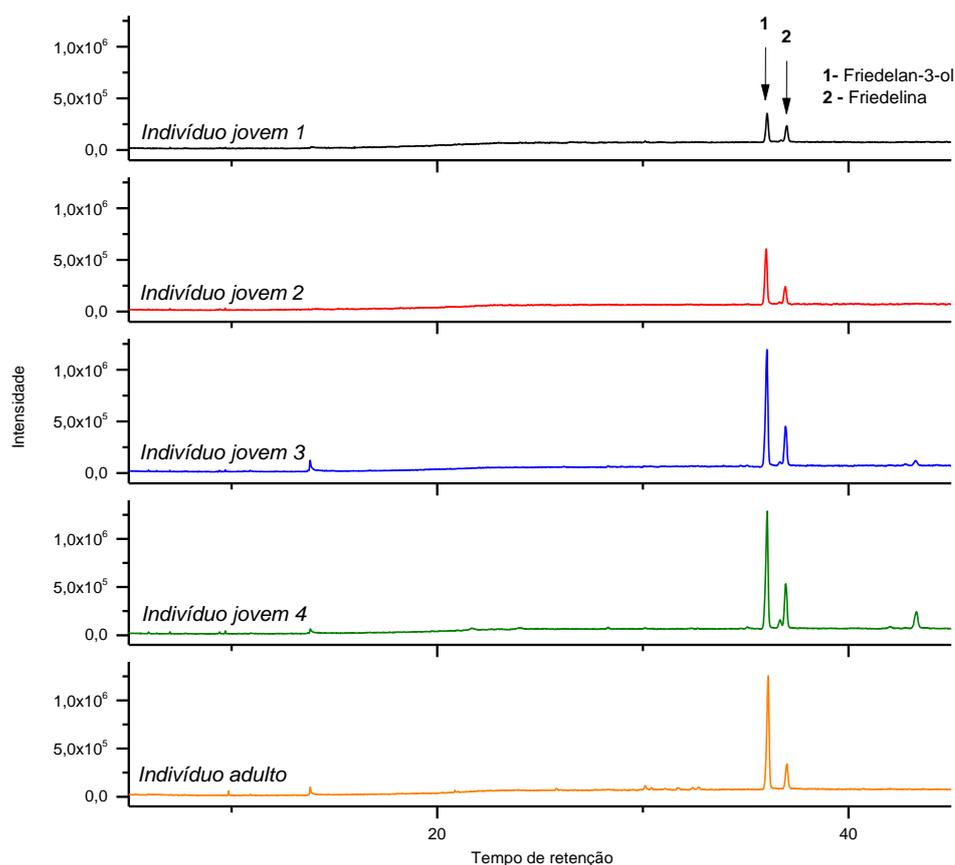
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PARTE 1 – Análise Química (IQ – UNESP Araraquara)

#### 5.1.1 Análise preliminar dos extratos de baixa polaridade de *M. ilicifolia*

Antes de iniciar o estudo do transcriptoma de *M. ilicifolia*, foram realizadas análises por CG-EM dos extratos de baixa polaridade de suas folhas com a finalidade de confirmar se a planta em estudo está produzindo as duas substâncias de interesse, a friedelina e o friedelan-3-ol. Para tal, tanto as folhas dos indivíduos jovens quanto as do indivíduo adulto foram coletadas e submetidas ao procedimento de extração e de análise cromatográfica descritos.

A Figura 13 resume de forma simplificada os cromatogramas obtidos para cada uma das amostras.



**Figura 13** – Cromatogramas obtidos por meio de CG-EM para cada uma das amostras vegetais (análise preliminar).

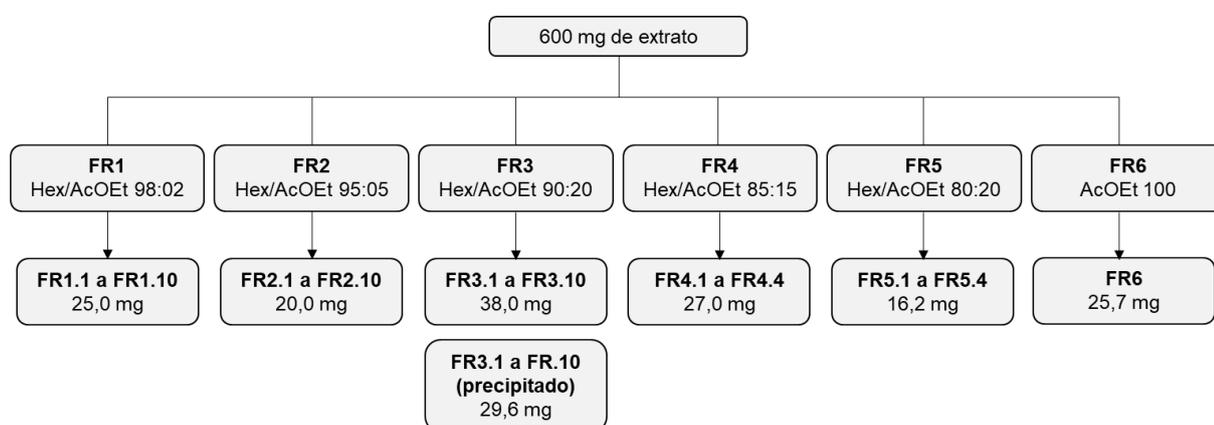
**Fonte:** elaborada pela autora.

Sabendo-se que ambos os metabólitos estão sendo produzidos pela planta, o isolamento do padrão de friedelan-3-ol e a extração do RNA total das folhas foram realizados subsequentemente.

### 5.1.2 Isolamento e caracterização do padrão de friedelan-3-ol

#### 5.1.2.1 Fracionamento cromatográfico do extrato

Cerca de 600 mg de extrato das folhas do indivíduo adulto de *M. ilicifolia*, dispersos em sílica gel, foram submetidos ao fracionamento em coluna de sílica-gel. Obteve-se, no total, 38 frações eluídas com misturas de Hex/AcOEt, como descrito na Figura 14, com destaque para a fração FR3 que apresentou maior massa em relação às demais.



**Figura 14** – Massas das frações coletadas no fracionamento do extrato da folha de *M. ilicifolia*.

**Fonte:** elaborada pela autora.

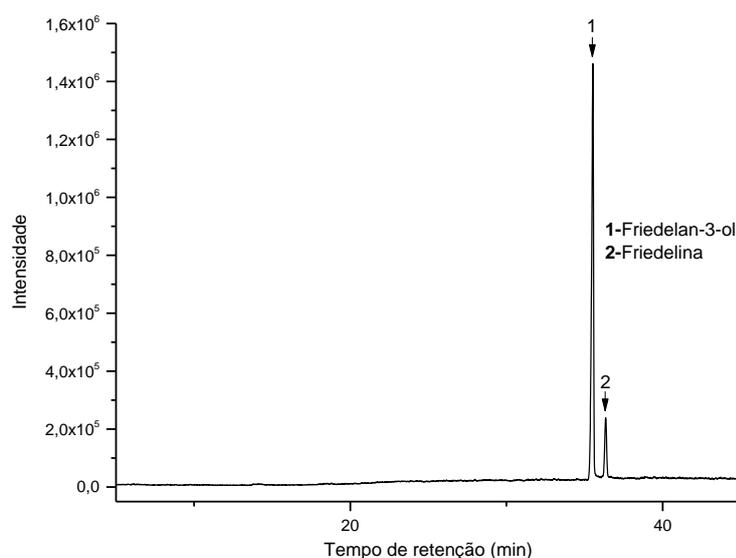
Essas frações foram submetidas à análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) na tentativa de determinar em qual das frações os triterpenos estariam eluindo.

#### 5.1.2.2 Padrão de friedelan-3-ol: análise e caracterização por CG-EM e RMN <sup>13</sup>C

Durante a coleta das subfrações da fração FR3 foi observado um precipitado branco na saída da coluna, o qual foi coletado em frascos separados e submetido à CCD da mesma forma que para as subfrações líquidas de FR3. Durante a revelação com anisaldeído, foi observado uma mancha rosa/lilás (GERLACH *et al.*, 2018) em todas elas sugerindo a presença de terpenos. Dessa forma, foi escolhido o

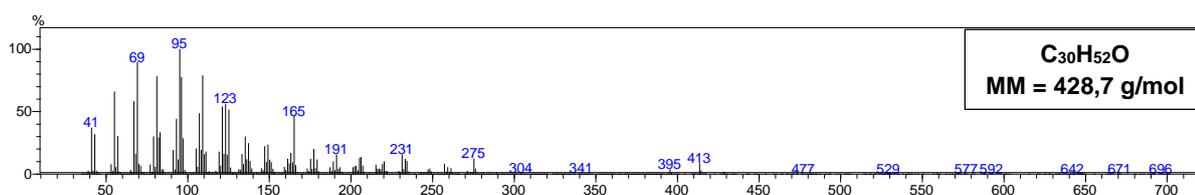
precipitado da subfração FR3.5 para análise de CG-EM e RMN de  $^{13}\text{C}$  por ter apresentado menos manchas na placa (ANEXO A).

Na análise de CG-EM (Figura 15), foi empregada a metodologia de Corsino (CORSINO, 2001), a mesma utilizada na análise prévia dos extratos de baixa polaridade das folhas de *M. ilicifolia*. Os dados obtidos foram analisados por meio da comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico com os espectros presentes em bibliotecas da NIST (*National Institute of Standards Technology*) (Figuras 16 e 17).



**Figura 15** – Cromatograma obtido para o precipitado da subfração FR3.5.

**Fonte:** elaborada pela autora.



**Figura 16** – Espectro de massas experimental do friedelan-3-ol.

**Fonte:** elaborada pela autora.

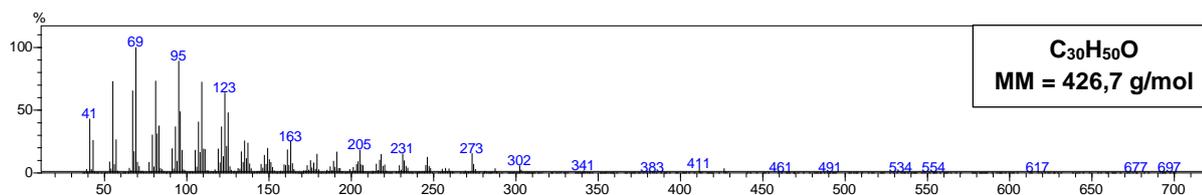


Figura 17 – Espectro de massas experimental da friedelina.

Fonte: elaborada pela autora.

Pela análise do cromatograma obtido (Figura 15) pode-se observar que o isolamento não foi completo tendo em vista a presença do pico referente à substância friedelina em tempo de retenção aproximado de 36 min. Contudo, o índice de similaridade entre os espectros de massas obtidos e os espectros de massas presentes na biblioteca foram elevados: 86% para o friedelan-3-ol e 94% para a friedelina, sendo suficientes para uma primeira identificação.

Pelo fato das moléculas de terpenos, principalmente os triterpenos, apresentarem muitos centros estereogênicos, a análise de RMN de  $^1\text{H}$  é mais complexa uma vez que a presença de hidrogênios diastereotópicos dificultaria a visualização e análise dos acoplamentos. Então, para confirmação da estrutura molecular, foi feita a comparação com dados da literatura do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

A principal evidência de que a substância isolada se trata do friedelan-3-ol é o deslocamento químico do carbono 3 (Figuras 18 e 19 e Tabela 14). O esperado para a molécula de friedelina é um deslocamento típico dos grupos cetônicos próximo à 200 ppm. Contudo, o observado é um deslocamento de aproximadamente 73 ppm, típico de carbono carbinólico.

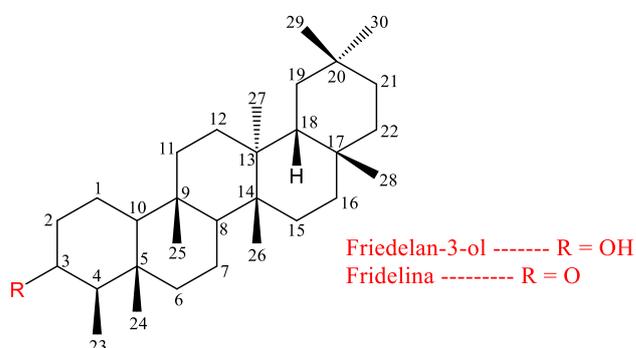


Figura 18 – Esqueleto básico das moléculas de friedelina e friedelan-3-ol.

Fonte: elaborada pela autora.

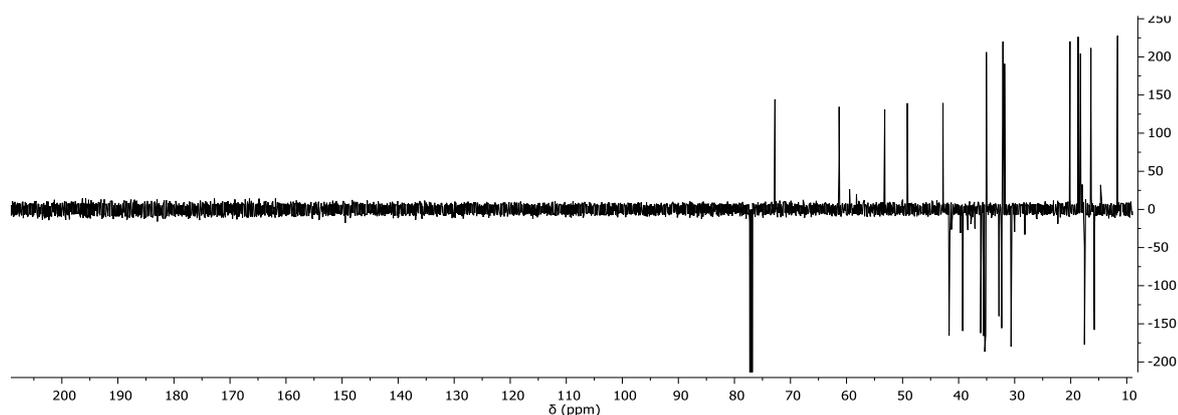


Figura 19 – Espectro DEPTQ da fração FR3.5.

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 14 – Dados de RMN <sup>13</sup>C obtido para a fração FR3.5 isolada em comparação com os dados da literatura (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) para tal e para friedelina. Experimento realizado em clorofórmio deuterado (600 MHz).

Posição	Fração FR3.5	Friedelan-3-ol (THUY; CUONG; SUNG, 2007)	Friedelina (THUY; CUONG; SUNG, 2007)
	δ C	δ C	δ C
1	18,25	18,66	22,29
2	39,66	39,3	41,53
3	72,76	72,78	213,18
4	53,18	53,22	58,24
5	41,27	39,7	42,15
6	41,54	41,75	41,31
7	16,4	17,57	18,25
8	49,15	49,2	53,12
9	37,82	37,85	37,46
10	61,32	61,38	59,5
11	35,33	32,84	35,64
12	31,8	30,66	30,52
13	39,28	38,39	39,71
14	37,089	37,13	38,32
15	32,09	30,66	32,8
16	35,16	32,36	36,03
17	38,36	37,86	30,01
18	42,79	42,85	42,82
19	35,54	32,84	35,36
20	30,5	30,04	28,17
21	35,04	32,35	32,44
22	41,7	41,75	39,26
23	11,64	11,63	6,82
24	15,78	16,41	14,66

25	20,13	20,13	17,95
26	18,67	18,66	20,26
27	17,5	18,26	18,66
28	32,3	31,81	32,1
29	30,6	30,04	31,79
30	32,79	32,1	35,03

Fonte: elaborada pela autora.

## 5.2 PARTE 2 – Biologia Molecular e Microbiologia (FCFar – UNESP Araraquara)

### 5.2.1 Análise do transcriptoma de *M. ilicifolia* por bioinformática

Na análise pelo BLAST2GO, dos 163.780 transcritos obtidos pela montagem *De Novo* do transcriptoma de *M. ilicifolia*, 10 alinham com duas enzimas do tipo 3-ceto redutase e uma com 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (HSD17B).

- *accession number* KFO20391.1 – organismo: *Fukomys damarensis*
- *accession number* XP\_021016281.1 – organismo: *Mus caroli*
- *accession number* EDL39167.1 – organismo: *Mus musculus*

Já para *Q. suber*, 15 transcritos de um total de 65.969, se alinham com uma enzima 3-ceto redutase:

- *accession number* NP\_034606.3 – organismo: *Mus musculus*

As quatro enzimas que alinham com os transcritos de *M. ilicifolia* e de *Q. suber* são provenientes de espécies de roedores e apresentam alta similaridade entre suas sequências. A Tabela 15 abaixo descreve detalhadamente a quantificação desses 10 transcritos de *M. ilicifolia* bem como o *e-value* e similaridade de cada um.

**Tabela 15** – Quantificação dos transcritos de *M. ilicifolia* que alinham com enzimas 3-ceto redutase.

Transcrito	Tamanho	TPMF1	TPMF2	TPMR1	TPMR2	Descrição	e.Value	Similaridade
42663_c0_g2_i1	1358	0,06	31,77	0,69	0,60	KFO20391.1	1,56E-10	55,82
42663_c0_g2_i2	1442	37,47	55,65	0,21	0,24	KFO20391.1	1,59E-10	55,92
42663_c0_g2_i3	1435	10,48	13,52	0,08	0,08	KFO20391.1	1,49E-10	55,81
42663_c0_g2_i6	2650	2,60	18,16	1,06	0,73	KFO20391.1	3,83E-10	55,92
45855_c1_g1_i12	1282	6,44	7,20	4,79	3,58	EDL39167.1	2,78E-10	61,18
45855_c1_g1_i6	1305	1,88	20,10	24,17	28,55	EDL39167.1	2,44E-10	61,18
45855_c1_g1_i9	1123	6,47	11,04	0,54	21,19	EDL39167.1	1,33E-10	61,12
52338_c2_g4_i1	1601	27,59	0,12	0,02	0,00	XP_021016281.1	6,14E-11	59,66
52338_c2_g4_i5	1727	17,85	5,10	0,06	0,01	XP_021016281.1	5,09E-11	59,04
52338_c2_g4_i6	1810	13,09	0,03	0,02	0,01	XP_021016281.1	1,11E-10	59,14

**Legenda:** TPMF1 (indivíduo adulto); TPMF2, TPMP1 e TPMP2 (indivíduos jovens).

**Fonte:** elaborada pela autora.

De acordo com os valores de TPM, é possível observar que praticamente todos os transcritos são mais expressos nas folhas de *M. ilicifolia* do que nas raízes, corroborando com o fato de que friedelina e friedelan-3-ol são encontrados nas partes aéreas da planta e não em outros órgãos. A similaridade entre os transcritos e as enzimas é considerável, passando de 55% e o *e-value*, cujo significado é a probabilidade de ter um resultado melhor que o obtido, está na escala de  $10^{-10}$ , ambos sugerindo uma boa compatibilidade enzima-transcrito.

Similar aos transcritos de *M. ilicifolia*, os valores de similaridade e *e-value* obtidos para os 15 transcritos de *Q. suber* que alinham com enzima 3-ceto redutase estão resumidos na Tabela 16.

**Tabela 16** – Transcritos de *Q. suber* que alinham com enzimas 3-ceto redutase.

Transcrito	Tamanho	e-Value	Similaridade	Descrição
XM_024031051.1	1265	5,00E-07	55.54	NP_034606.3
XM_024031052.1	1304	6,22E-07	55.34	NP_034606.3
XM_024031053.1	1371	4,65E-07	55.68	NP_034606.3
XM_024031054.1	1576	9,48E-05	53.2	NP_034606.3
XM_024031055.1	1674	9,92E-05	53.2	NP_034606.3
XM_024031056.1	1671	1,01E-04	53.2	NP_034606.3
XM_024031057.1	1573	9,12E-05	53.99	NP_034606.3
XM_024031058.1	1670	9,64E-05	53.99	NP_034606.3
XM_024031059.1	1668	1,17E-04	53.1	NP_034606.3
XM_024031060.1	1668	9,96E-05	53.2	NP_034606.3
XM_024031061.1	1489	1,35E-04	53.99	NP_034606.3
XM_024031070.1	1520	2,69E-04	54.18	NP_034606.3
XM_024031072.1	1517	2,68E-04	54.18	NP_034606.3
XM_024037196.1	1333	4,66E-05	52.74	NP_034606.3
XM_024068087.1	1324	5,13E-05	53.45	NP_034606.3

**Fonte:** elaborada pela autora.

Os 10 transcritos de *M. ilicifolia* e os 15 transcritos de *Q. suber* foram alinhados um a um entre si, a fim de buscar transcritos em comum nas duas espécies. Como resultado, 6 transcritos de *M. ilicifolia* se alinharam aos 15 transcritos de *Q. suber* com elevada identidade e cobertura (*query cover*) (Tabela 17). São eles: 45855\_c1\_g1\_i12; 45855\_c1\_g1\_i6; 45855\_c1\_g1\_i9; 52338\_c2\_g4\_i5; 52338\_c2\_g4\_i1; 52338\_c2\_g4\_i6.

Tabela 17 – Transcritos de *M. ilicifolia* que se alinharam com os 15 transcritos de *Q. suber*.

Accession number ( <i>Q. suber</i> )	Query Cover	Identidade	Transcritos de <i>M. ilicifolia</i>					
			T1	T2	T3	T4	T5	T6
XM_024031051.1	49-83	73-76						
XM_024031052.1	49-83	73-76						
XM_024031053.1	49-83	73-76						
XM_024031054.1	50-83	75-77						
XM_024031055.1	50-83	75-77						
XM_024031056.1	50-83	75-77	45855_c1_g1_i12	45855_c1_g1_i6	45855_c1_g1_i9	52338_c2_g4_i1	52338_c2_g4_i5	52338_c2_g4_i6
XM_024031057.1	49-83	75-77						
XM_024031058.1	49-83	75-77						
XM_024031059.1	50-83	75-77						
XM_024031060.1	50-83	75-77						
XM_024031061.1	45-74	75-78						
XM_024031070.1	50-83	74-77						
XM_024031072.1	49-83	75-77						
XM_024037196.1	49-83	74-79						
XM_024068087.1	50-83	73-79						

Fonte: elaborada pela autora.

Foi feito alinhamento múltiplo entre as três isoformas dos transcritos sob código 45855 e entre as três isoformas dos transcritos sob código 52338 cujo resultado indicou que aquelas do mesmo grupo são muito semelhantes entre si.

Para a clonagem destes transcritos, foi verificado se a sequência de nucleotídeos de cada um estava completa, ou seja, começando no *start* códon e finalizando no *stop* códon. Para isso, foi feita uma análise utilizando a ferramenta *blastx* na qual foi observado que seria necessário obter o complementar-reverso de cada um uma vez que a ORF pertencia à fita *reverse* do DNA. Dessa forma, a sequência de nucleotídeos e, conseqüentemente, de aminoácidos estaria no sentido correto. O complementar reverso de cada um foi traduzido em 6 fases de leitura por meio do *Transeq Emboss* e cada uma foi comparada com o resultado obtido pelo *blastx* com a finalidade de se obter a fase de leitura correta. Somente o transcrito DN52338\_c2\_g4\_i5 apresentou duas fases de leitura possíveis e, a princípio, ele foi descartado das análises seguintes.

As sequências das três isoformas DN45855 e das duas isoformas DN52338 estavam completas e apresentaram uma cadeia primária de 315 e 244 aminoácidos, respectivamente.

Sabe-se que, ao analisar o transcriptoma de *M. ilicifolia* frente à uma biblioteca específica de 3-ceto redutase, pode tornar os resultados tendenciosos uma vez que tal enzima ainda não foi identificada em espécies vegetais e o melhor alinhamento para cada um dos 5 transcritos foi obtido quando comparado com enzimas provenientes de espécies de roedores. A análise pelo *blastp* voltada para plantas (taxid: 3193) retornou enzimas diferentes oriundas de *Tripterygium wilfordii* e com identidade maior que as das obtidas através do *blastx* pela biblioteca de 3-ceto redutase (Tabela 18). Tal resultado corrobora com a alta similaridade entre os transcritos *M. ilicifolia* e *Tripterygium* sp. observada por (SANTONI *et al.*, 2021) uma vez que ambos os gêneros fazem parte da família Celastraceae.

**Tabela 18** – Porcentagem de identidade entre os transcritos e as enzimas da biblioteca e as enzimas obtidas pelo *blastp* (taxid: 3193).

Transcrito	Biblioteca	Organismo	Identidade	<i>Blastp</i>	Organismo	Identidade
45855_c1_g1_i12	EDL39167.1	<i>Mus musculus</i>	26,05%	XP_038694669.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	91,75%
45855_c1_g1_i6	EDL39167.1	<i>Mus musculus</i>	26,05%	XP_038694669.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	92,06%
45855_c1_g1_i9	EDL39167.1	<i>Mus musculus</i>	26,05%	XP_038694669.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	91,11%
52338_c2_g4_i1	XP_021016281.1	<i>Mus caroli</i>	23,77%	XP_038684576.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	85,84%
52338_c2_g4_i6	XP_021016281.1	<i>Mus caroli</i>	23,77%	XP_038684576.1	<i>Tripterygium wilfordii</i>	84,96%

**Fonte:** elaborada pela autora.

As enzimas obtidas através da ferramenta *blastp* pertencem à família “*Short-Chain Dehydrogenase/Reductase*” (SDR). Ela engloba uma série de subclasses de enzimas cuja função catalítica é a oxidorredução e a 3-ceto redutase é um exemplo clássico desta família (LU *et al.*, 2020; NCBI, 2022). As SDRs apresentam um único domínio e compreendem tipicamente cerca de 250 aminoácidos, enquanto SDRs maiores abrangem aproximadamente 350 aminoácidos. Valores muito próximos dos obtidos para os transcritos.

O reconhecimento de uma SDR é baseado em certos *motifs* específicos da família tais como o TGXXXGXG responsável pela ligação com o cofator, o NNAG que estabiliza a folha  $\beta$  e um *motif* do sítio ativo YXXXK, com a tirosina (Y) servindo como resíduo catalítico crítico. Além da tirosina (Y) e lisina (K), geralmente existe um resíduo de serina (S) *upstream* e/ou um resíduo de asparagina (N) contribuindo para o sítio ativo (HÖRMANN *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2020; MOUMMOU *et al.*, 2012; NCBI, 2022).

As Figuras 20 e 21 descrevem os alinhamentos entre os transcritos 45855 e 52338, respectivamente, com as enzimas obtidas tanto da biblioteca quanto do *blastp* e destacam os *motifs* característicos de SDR descritos acima (verde para ligação com cofator, amarelo para estabilização da folha  $\beta$  e vermelho para sítio catalítico).

```

17B-HSD      1  -----MRKVVLTGASSGIGLALCGRLLAEDDDLHLCL
45855_i9     1  MWIFGWKGPSGFSASSTAEVTRIDGTGLTALITGASSGIGVETARVL--ALRGVHVVM
45855_i12    1  MWIFGWKGPSGFSASSTAEVTRGIDGAGLTALITGASSGIGVETARVL--ALRGVHVVM
45855_i6     1  MWIFGWKGPSGFSASSTAEVTRGIDGTGLTALITGASSGIGVETARVL--ALRGVHVVM
SDR_i6       1  MWIFGWKGPSGFSASSTAEVTRGIDGTGLTALITGASSGIGVETARVL--ALRGVHVIM
SDR_i12      1  MWIFGRKGPSGFSASSTAEVTRGIDGAGLTALITGASSGIGVETTRVL--ALRGVHVIM
SDR_i9       1  MWIFSWKGPSGFSASSTAEVTRGIDGTGLTALITGASSGIGVETTRVL--TLRGVHVIM
    
```

```

17B-HSD      34  ACRNLSKARAVRDTILASHPSAEVSIQMDVSSLQSVVRGAEVVKQKQRLDYLYLNAGI
45855_i9     59  AVRNLKAGKIIVRETILEKNSLAKIDVMELDLSSMASVRKFASEYNSLGLPLNLLINNAGV
45855_i12    59  AVRNLKAGKIIVRETILEKNSLAKIDVMELDLSSMASVRKFASEYNSLGLPLNLLINNAGV
45855_i6     59  AVRNLKAGKIIVRETILEKNSLAKIDVMELDLSSMASVRKFASEYNSLGLPLNLLINNAGV
SDR_i6       59  AVRNLKAGKIIVRETILEKNSLAKIDVMELDLSSMASVRKFASEYNSLGLPLNLLINNAGV
SDR_i12      59  AVRNLKAGKIIVRETILEKNSLAKIDVMELDLSSMASVRKFASEYNSLGLPLNLLINNAGV
SDR_i9       59  AVRNLKAGKIIVRETILEKNSLAKIDVMELDLSSMASVRKFASEYNSLGLPLNLLINNAGV
    
```

```

17B-HSD      94  TPNPQFNLKAFFCGIFSRNVIHMFTTAEGLTQNDVSVTADGIQEVFETNIFGHFILIREL
45855_i9     119 MAA-----PYTSLQDGIELQFATNHLGHFLLTNLL
45855_i12    119 MAA-----PYTSLQDGIELQFATNHLGHFLLTNLL
45855_i6     119 MAA-----PYTSLQDGIELQFATNHLGHFLLTNLL
SDR_i6       119 MAT-----PFTSLQDNIEIQFATNHLGHFLLTNLL
SDR_i12      119 MAT-----PFMLSQDNIEIQFATNHLGHFLLTNLL
SDR_i9       119 MAT-----PFKLSQDNIEIQFATNHLGHFLLTNLL
    
```

```

17B-HSD      154 EPLCHVDN----PSQIWTSSRN---AKKANFSLDITQHSK---GPEFYSSSKYATDILL
45855_i9     149 LETMKTARQSNREGRIINVSEGHRLTYSEGIRFDKINDQSSYNTLYAYAQSKLSNILH
45855_i12    149 LETMKTARQSNREGRIINVSEGHRLTYSEGIRFDKINDQSSYNTLYAYAQSKLSNILH
45855_i6     149 LETMKTARQSNREGRIINVSEGHRLTYSEGIRFDKINDQSSYNTLYAYAQSKLSNILH
SDR_i6       149 LETMKNARESNQEGRIINVSEGHRFAYHEGICFDKINDESGYNTIRAYGQSKLANILH
SDR_i12      149 LETMKNARESNQEGRIINVSEGHRFAYREGIRFDKINDESSYNSIYAYGQSKLANILH
SDR_i9       149 LETMKNARESNQEGRIINVSEGHRYAYREGIRFDKINDESGYNSIYAYGQSKLSNILH
    
```

```

17B-HSD      204 NVALNRNFNQKGLY--SSVMCPGVMTNMTYGILPPFIWTL LLPIMWL-LRFFVNALTVT
45855_i9     209 ANELRRLKEDGVEITANSLHPGSTATNLLRYH--SYI---NAIANMIGRFVLKNV---
45855_i12    209 ANELRRLKEDGVEITANSLHPGSTATNLLRYH--SYI---NAIANMIGRFVLKNV---
45855_i6     209 ANELRRLKEDGVEITANSLHPGSTATNLLRYH--SYI---NAIANMIGRFVLKNV---
SDR_i6       209 ANELSRQLKEDGVNITANSLHPGATDNNLLRHH--SIF---NGIVSLIGKYLIKNV---
SDR_i12      209 AKELSRILKAGVDITANALHPGAIVTNNLLRHH--GFF---NVIANMFGKFLKNV---
SDR_i9       209 ANELARLKEEGVEITANSLHPGAIVTNNLLRHH--SFL---NVLANTLGKYVLKNV---
    
```

```

17B-HSD      261 PYNLGAELVWLFHQKPESENLTKYASATSGFGTNYVTGQKVHNPLMLLSSEMCSITGQDA
45855_i9     260 -EQGAATTCYV-----ALHP-----QVKGVSGEYFMDSNIAKPSSK-----AKDA
45855_i12    260 -EQGAATTCYV-----ALHP-----QVKGVSGEYFMDSNIAKPSSK-----AKDA
45855_i6     260 -EQGAATTCYV-----ALHP-----QVKGVSGEYFMDSNIAKPSSK-----AKDA
    
```

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

SDR_i6	260	-QOGAATTCYV-----ALSP-----QVKGLTGEYFMSNLAKPNSQ-----AKDA
SDR_i12	260	-QOGAATTCYV-----ALNP-----QVKGVSGEYFMSNKANPSNL-----AKDA
SDR_i9	260	-PQGAATTCYV-----ALHP-----QVKGISGEYFMSNKAASSH-----GQDA
17β-HSD	321	ACDVHKPICLASASESSCWLYHGPFHYSQLSPVSECRASSFC
45855_i9	299	--S-----LAKKLWDFSLSLTS SQ-----
45855_i12	299	--S-----LAKKLWDFSLSLTSPK-----
45855_i6	299	--S-----LAKKLWDFSLSLTSPK-----
SDR_i6	299	--E-----LAKKLWDFSLKLTNPK-----
SDR_i12	299	--E-----LAKKLWDFSLNLTSPK-----
SDR_i9	299	--E-----LAKKLWDFSLSMVTNQ-----

**Figura 20** – Alinhamento dos transcritos 45855 com a enzima 17β-hidroxiesteroide desidrogenase (17β-HSD) e SDRs correspondentes de cada isoforma.

**Legenda:** 17β-HSD (EDL39167.1); SDR\_i6 (XP\_021668359.1); SDR\_i12 (XP\_015896091.1); SDR\_i9 (XP\_023892964.1). Tabela 18 para referência.

**Fonte:** elaborada pela autora.

3-cetored	1	-----MRKVVLTITGASSGIGLALCGRIILAEDDDIHLICL
SDR_i1_i6	1	MWFSRKGPSPGFSASSTAEVTVQIDGIGLTAIVTGASSGIGTETTRVL--ALRGVHVVM
52338_i1	1	MFCFGRKGPSPGFSASSTAEVTVQIDGSGLTAVITGASSGIGAETARVL--ALRGVHVFM
52338_i6	1	MFLFGRKSPSGFSASSTAEVTVQIDGSGLTAVITGASSGIGAETARVL--ALRGVHVFM
3-cetored	34	ACRNLSKARAVRDALLASHPSAEVSIQMDVSSIQSVVRGAEVVKQKQRLDYLYLNAGI
SDR_i1_i6	59	GVRNMSAGKEVKEAIVKEIPTAKVDAMELDLSSMASVRKFASDYNSSGPLNILLINNAGI
52338_i1	59	AVRNMAAGRHVKEAIVREIPNAKVDILELDLSSMASVRKFASDYSASRHPLNLLINNAGI
52338_i6	59	ADRNMAAGRHVKEAIVREIPNAKVDILELDLSSMASVRKFASDYSASRHPLNLLINNAGI
3-cetored	94	LPNPQFNLKAFFRGIFSRKVIHMFTTAEGLLTQNDTVTADGLQEVFETNLFQGHFILIREL
SDR_i1_i6	119	MAVPYM-----LSKDNIEMQFATNHLGHFLLTNLL
52338_i1	119	IGVPFM-----LSKDDIELHFATNHVGHFLLTSLL
52338_i6	119	IGVPFM-----LSKDDIELHFATNHVGHFLLTSLL
3-cetored	154	EPLICHADNP---SGLIWTSS---RNAKRTNFSLE---DIQHTKGPEPYSSSKYATDILL
SDR_i1_i6	149	LDTMKKTTRKSRKEGRIVNVSSMAHRYPYREGIRFDKINDKSGYSSLFAYGQSKLANVLH
52338_i1	149	LETMKKTARNSNREGRIVNVASVGHRLTYCEGIRFDKINDPSGYMGLAYGQSKLANVLH
52338_i6	149	LETMKKTARNSNREGRIVNVASVGHRLTYCEGIRFDKINDPSGYMGLAYGQSKLANVLH
3-cetored	204	NVALNRNFNQKGLY--SSVMCPGVMTNITYGILPPFIWTLTLLPMMWLIRFFVNSLTVTP
SDR_i1_i6	209	ANELARRFKEDGVDITANSLHPGAVTNIIFRCSISV--SGLVNTVVGKL---VL---KNV
52338_i1	209	ANQLAKNLKAGVFILKNRA-----IECSASN--SAHTTPREKK-----
52338_i6	209	ANQLAKNLKAGVFILKNRA-----IECSASN--SAHTTPREKK-----
3-cetored	262	YNGAEALVWLFHQKPESLNPLTKYVSATTGFGTNYVTG-----QKMDIDEDTAEKFFEYEV
SDR_i1_i6	260	QOGAATTCYV-----ALHPQ-----VKGVSGQYFSDCNIAKPSSQAKDPELAKKLWFEF
52338_i1		-----
52338_i6		-----
3-cetored	316	LELEKRVIRITIQSDHPS
SDR_i1_i6	308	SNLVK-----

52338\_i1 -----  
 52338\_i6 -----

**Figura 21** – Alinhamento dos transcritos 52338 com a enzima 3-ceto redutase e SDR correspondente.

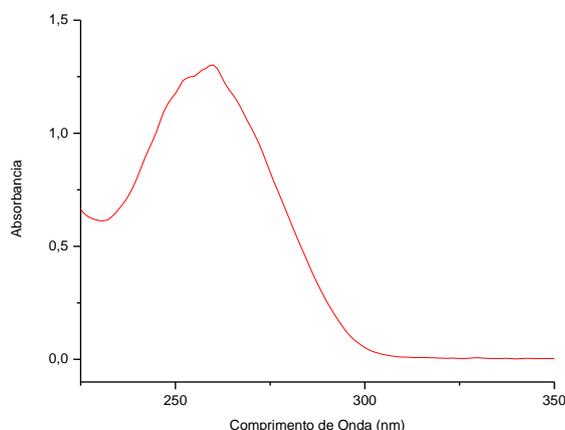
**Legenda:** 3-ceto redutase (XP\_021016281.1); SDR\_i1\_i6 (XP\_002270104.1). Tabela 18 para referência.

**Fonte:** elaborada pela autora.

Como observado nas figuras acima, as duas enzimas que se alinharam com os transcritos por meio da biblioteca (3-ceto redutase e 17 $\beta$ -HSD) também apresentam os mesmos *motifs* conservados de SDRs de plantas (*T. wilfordii*). Sendo assim, as informações obtidas através dos alinhamentos com a biblioteca e com o *blastp* convergem para a possibilidade de que tais enzimas possam estar envolvidas evolutivamente.

### 5.2.2 Extração do RNA total das folhas

Após extração do RNA total, o mesmo foi submetido às análises quantitativas e qualitativas, as quais estão relatadas nas Figuras 22 e 23, respectivamente.

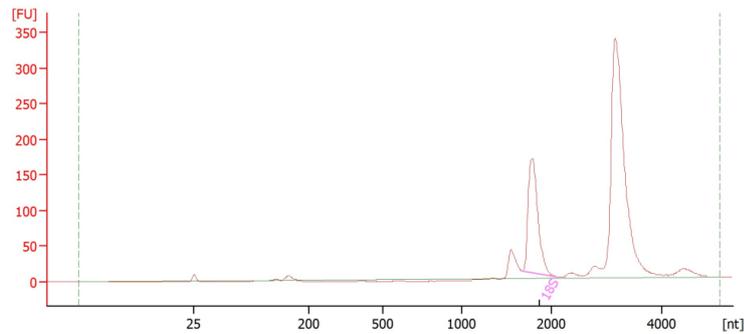


Concentração	260/280	260/230
562,4 ng/ $\mu$ L	2,09	2,23

**Figura 22** – Espectro no UV do RNA extraído.

**Fonte:** elaborada pela autora.

Pela análise do espectro e da tabela acima, pode-se dizer que o RNA extraído encontra-se livre de contaminantes tendo em vista a ausência de bandas próximas a 230 nm e 280 nm, sendo sua banda de maior absorção em 260 nm, característica de ácidos nucleicos.



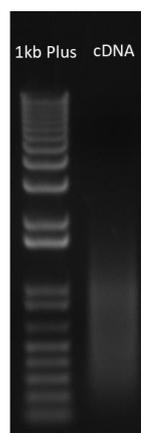
**Figura 23** – Eletroferograma da RNA extraído.

**Fonte:** elaborada pela autora.

Já o eletroferograma apresenta duas bandas, uma de menor tamanho referente à subunidade 18S do rRNA e outra banda de maior tamanho referente à subunidade 28S do rRNA. Tendo em vista que o RNA total é composto por apenas 1-3% de mRNA e cerca de 80% de rRNA, a integridade do mRNA extraído baseia-se no pressuposto de que ela é reflexo da qualidade e a integridade do rRNA (SCIENTIFIC, 2019b).

### 5.2.3 Síntese da biblioteca de cDNA por RT-PCR

O cDNA foi sintetizado utilizando o RNA extraído como molde por RT-PCR e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Um cDNA de alta qualidade se apresentará como um arraste no gel de agarose, tendo em vista que ele é sintetizado a partir de vários fragmentos de mRNA de tamanhos diferentes, como pode ser evidenciado na Figura 24.



**Figura 24** – Gel de eletroforese contendo o padrão de tamanhos no 1º poço e o cDNA sintetizado no 2º poço.

**Fonte:** elaborada pela autora.

5.2.4 Desgin de primers e confirmação dos transcritos DN45855 e DN52338

Baseado no alinhamento múltiplo das isoformas DN45855 e DN52338, foram desenhados dois pares de primers para cada grupo em suas regiões conservadas com o intuito de confirmar a presença de tais transcritos em uma amostra real (ANEXO C).

Cada par foi desenhado em regiões comuns em cada grupo de transcritos de forma que o amplicon (entre um primer *forward* e um primer *reverse*) apresente tamanho máximo aproximado de 800 pb. As informações de cada primer bem como o posicionamento de cada um deles pode ser encontrado nas Figuras 25 e 26 e Tabelas 19 e 20.



Figura 25 – Mapa dos pares de primers na sequência de DN45855.

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 19 – Pares de primers para o grupo DN45855.

	5'-3'	Tamanho (pb)	T <sub>m</sub> (°C)	GC (%)	Amplicon (pb)
Primer F1	<b>CTCGGCTTGGCTATGTTACTG</b>	21	63,5	52,3	410
Primer R1	<b>GCTCGTCAAAGCAATAGAGAGG</b>	22	64,1	50	
Primer F2	<b>GAGATTCAGAGGAAGTCCCAAG</b>	22	63,0	50	259
Primer R2	<b>CGATGGAAGTGGTCTTACTGC</b>	21	63,5	52,3	

Fonte: elaborada pela autora.

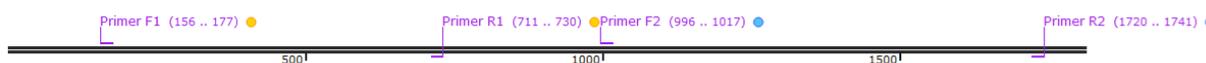


Figura 26 – Mapa dos pares de primers na sequência de DN52338.

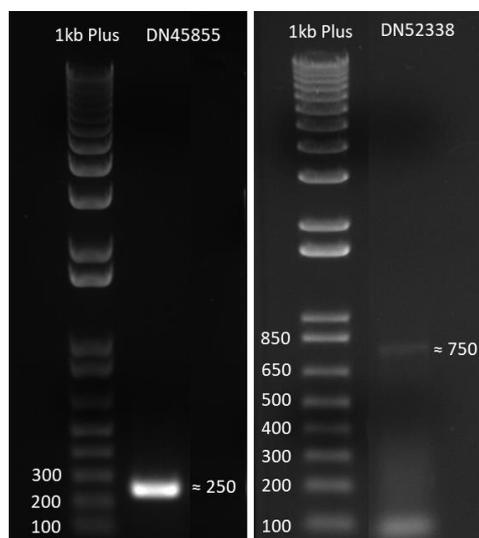
Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 20 – Pares de primers para o grupo DN52338.

	5'-3'	Tamanho (pb)	T <sub>m</sub> (°C)	GC (%)	Amplicon (pb)
Primer F1	<b>GGAAGCCAATAACTCATAGCC</b>	22	62,7	50	575
Primer R1	<b>ATTGGAAGGGACAAGTGGTG</b>	20	63,8	50	
Primer F2	<b>CACTATTCGACGCAGAACACTC</b>	22	63,7	50	746
Primer R2	<b>GCATCATTACACAGAGGGACTG</b>	22	63,4	50	

Fonte: elaborada pela autora.

O produto de cada PCR foi subsequentemente analisado em gel de agarose 0,8% no qual foi possível observar os tamanhos dos amplicons gerados por cada par comparado com o *Ladder 1 kb Plus* (Figura 27).



**Figura 27** – Produtos de PCR de cada grupo de isoformas (DN45855 e DN52338) obtidos utilizando pares de primers F2 e R2 pré-desenhados para confirmação dos transcritos de interesse.

**Fonte:** elaborada pela autora.

De acordo com a imagem acima, tanto as isoformas DN45855 quanto as DN52338 foram amplificadas pelo par de primers F2 e R2 pré-desenhados para cada grupo. O tamanho dos amplicons formados corroboram com os valores presentes nas Tabelas 19 e 20 para esses pares de primers sugerindo que tais transcritos existem em uma amostra real.

#### 5.2.5 Design de primers com attB e amplificação do cDNA para clonagem via Gateway

Para que a clonagem via Gateway fosse eficiente, os primers *forward* e *reverse* foram desenhados de acordo com o protocolo do fabricante (INVITROGEN, 2012).

Em ambos os primers, a extremidade 5' deveria conter 4 resíduos de guanidina (G), seguido de 25 pares de base do sítio *attB* (*forward* ou *reverse*) e, subsequentemente, por 18-25 pares de base da sequência inicial ou terminal do transcrito. Para manter a fase de leitura, foram adicionados 2 nucleotídeos entre a sequência *attB forward* e a sequência inicial do transcrito e 1 nucleotídeo entre a sequência *attB reverse* e a sequência terminal do transcrito (Tabela 21) (INVITROGEN, 2012).

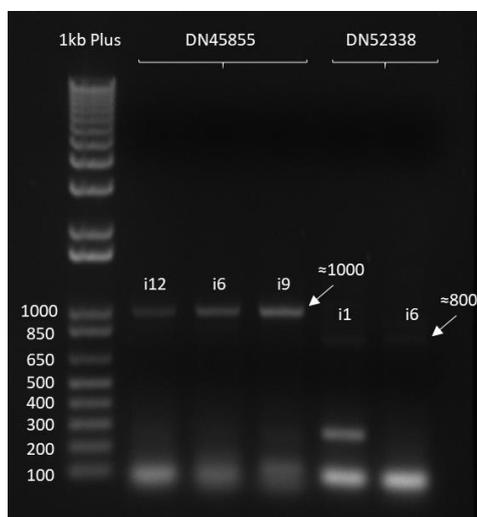
**Tabela 21** – Primers contendo sequências recombinantes (*attB*) para clonagem via Gateway.

Primer	Sequência (5'-3')	T <sub>m</sub>	%GC	Amplicon (pb)
<i>attB</i> +F_45855_i6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAATGTGGATTTTGGGTGGAAG	67,2	42,3	1009
<i>attB</i> +R_45855_i6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTACTTTGGAGAGGTTAAGC	67,7	48	
<i>attB</i> +F_45855_i9	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAATGTGGATTTTGGGTGGAAG	67,2	42,3	1009
<i>attB</i> +R_45855_i9	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTACTGTGAAGAGGTCAAACCTC	67,9	48,1	
<i>attB</i> +F_45855_i12	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAATGTGGATTTTGGGTGGAAG	67,2	42,3	1009
<i>attB</i> +R_45855_i12	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTACTTTGGAGAGGTTAAGC	67,7	48	
<i>attB</i> +F_52338_i6	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAATGTTTCTTTTGGGAAGGAAGAG	66,1	38,9	796
<i>attB</i> +R_52338_i6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACTTTTTTCCCGAGGC	68,6	49	
<i>attB</i> +F_52338_i1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAATGTTTTGTTTTGGGAAGGAAGG	66,5	39,6	796
<i>attB</i> +R_52338_i1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCACTTTTTTCCCGAGGC	68,6	49	

**Legenda** – *em verde*: 4 unidades de guanidina (G); *em vermelho*: sequência *attB* forward e reverse; *em azul*: nucleotídeos adicionados para manter fase de leitura; *em preto*: sequência inicial e terminal dos transcritos.

**Fonte**: elaborada pela autora.

Os transcritos amplificados foram analisados em gel de eletroforese (Figura 28) no qual foi possível observar os tamanhos esperados dos amplicons descritos na Tabela 21. Dessa forma, a sequência completa de cada transcrito está pronta para clonagem recombinante.



**Figura 28** – Produtos de PCR de cada grupo de isoformas (DN45855 e DN52338) obtidos utilizando os primers com sequência recombinante (*attB*) pré-desenhados para clonagem dos transcritos via Gateway.

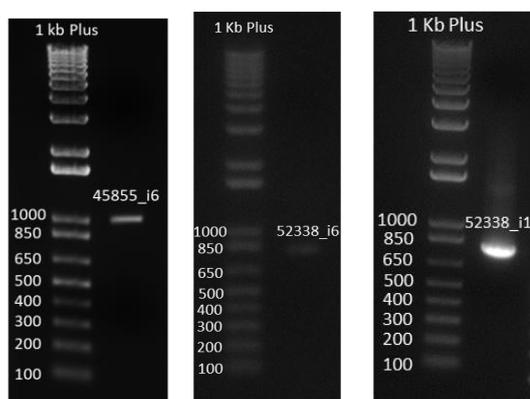
**Fonte**: elaborada pela autora.

Como demonstrado na Tabela 21, tanto o transcrito 45855\_i6 quanto o 45855\_12 apresentam os mesmos pares de primers, dificultando a diferenciação

entre ambos durante a etapa de clonagem. Apesar da terceira isoforma 45855\_i9 ter sido clonada e sequenciada, sua transformação em levedura não foi bem sucedida devido à baixa eficiência obtida, provavelmente ocasionada por uma debilitação da levedura utilizada cuja linhagem apresenta o maior número de modificações genéticas. Dessa maneira, somente o transcrito 45855\_i6 deste conjunto de isoformas foi submetido à todas as etapas.

### 5.2.6 Clonagem dos transcritos 45855\_i6; 52338\_i1 e 52338\_i6

Primeiramente, foi feita PCR em larga escala com primer *attB* para obtenção de maior quantidade dos transcritos. Partindo de 125 µL de reação, foi possível obter 5,4 ng/µL (45855\_i6), 5,2 ng/µL (52338\_i6) e 29,6 ng/µL (52338\_i1), todos purificados (Figura 29).



**Figura 29** – Transcritos purificados 45855\_i6, 52338\_i6 e 52338\_i1 sintetizados por PCR com primer *attB*.

**Fonte:** elaborada pela autora.

Concomitantemente, foram preparados inóculos do vetor de doação pDONR207 em meio LB com gentamicina para sua extração a qual resultou em concentrações de 132 ng/µL e 163,3 ng/µL.

Utilizando a fórmula de conversão citada no item 4.2.6 na sessão “Métodos”, 50 fmol dos transcritos 45855 é equivalente a 31,3 ng e do transcrito 52338 é 24,2 ng. Já para o vetor pDONR207, 50 fmol é equivalente a 184 ng. Exemplificando:

#### 45855\_i6

$$ng = (50 \text{ fmol}) * (948 \text{ pb}) * \frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} * \frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}}$$

$$ng = 31,3$$

#### 52338\_i1 e 52338\_i6

$$ng = (50 \text{ fmol}) * (735 \text{ pb}) * \frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} * \frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}}$$

$$ng = 24,2$$

**pDONR207**

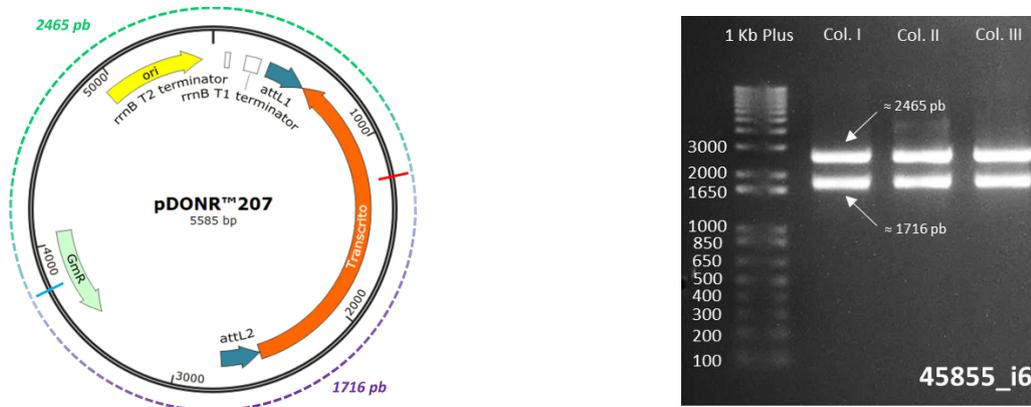
$$ng = (50 \text{ fmol}) * (5585 \text{ pb}) * \frac{660 \text{ fg}}{\text{fmol}} * \frac{1 \text{ ng}}{10^6 \text{ fg}}$$

$$ng = 184$$

Sabendo-se a quantidade em nanogramas e a concentração de cada um, foi possível calcular os volumes necessários para a reação BP, como descrito na Tabela 4 (item 4.2.6 em “Métodos”).

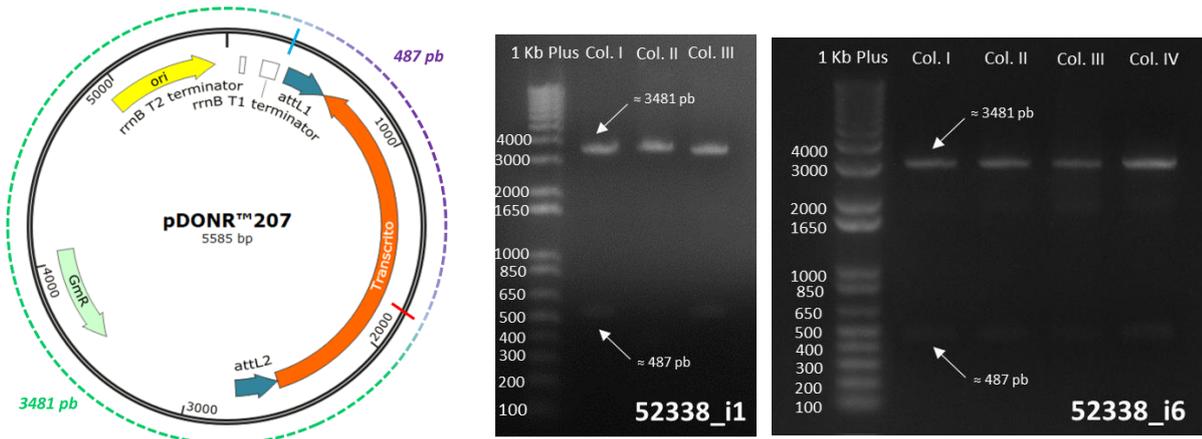
Após transformação de toda a mistura reacional em *E. coli* com meio seletivo (LB + gentamicina), várias colônias foram observadas nas placas de Petri. Para cada transcrito, 4 colônias foram selecionadas e inoculadas em *shaker* a 37°C em LB líquido + gentamicina e o vetor pDONR207+transcrito extraído.

Para verificar a eficiência da clonagem, o vetor pDONR207+45855\_i6 foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Bgl*III e os vetores pDONR+52338\_i1 e pDONR207+52338\_i6 à digestão com enzima de restrição *Hpa*I cujas reações dividiram os plasmídeos em 2 fragmentos de tamanhos conhecidos e observados em eletroforese de gel de agarose 0,8% (Figuras 30 e 31).



**Figura 30** – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pDONR207+45855\_i6 com a enzima de restrição *Bgl*III.

**Fonte:** elaborada pela autora.

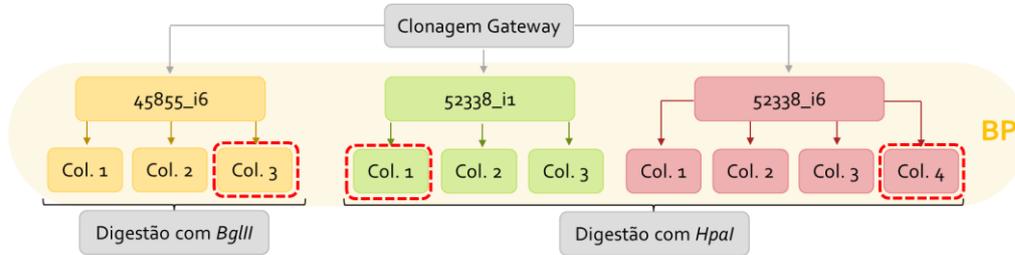


**Figura 31** – Fragmentos gerados pela digestão dos vetores pDONR207+52338\_i1 e pDONR207+52338\_i6 com a enzima de restrição *HpaI*.

**Fonte:** elaborada pela autora.

A escolha destas enzimas de restrição foi feita justamente pelo fato delas fragmentarem o plasmídeo nas 2 regiões indicadas nas figuras acima, uma na própria sequência do vetor (em azul) e outra na sequência do transcrito (em vermelho). Dessa forma, a presença dos 2 fragmentos de tamanhos 2465 pb e 1716 pb para a *BglII* e 2 fragmentos de tamanho 487 pb e 3481 pb para a *HpaI* observados em gel de eletroforese, indica, evidentemente, que os transcritos foram incorporados nos plasmídeos e que, portanto, as clonagens foram eficientes. Caso fossem ineficientes, ou seja, sem incorporação dos transcritos, as enzimas fragmentariam o vetor exclusivamente na região indicada em azul gerando um só fragmento de tamanho 5585 pb referente ao plasmídeo linearizado.

Através dessas análises foi possível observar que todas as colônias geradas pela BP dos três transcritos foram clonadas efetivamente, com exceção das colônias 4 dos transcritos 45855\_i6 e 52338\_i1 que não cresceram no meio seletivo. Apenas uma colônia de cada transcrito foi escolhida arbitrariamente para dar continuidade ao processo de clonagem. A Figura 32 abaixo resume esta primeira etapa de clonagem dos três transcritos com as colônias selecionadas para a próxima etapa.



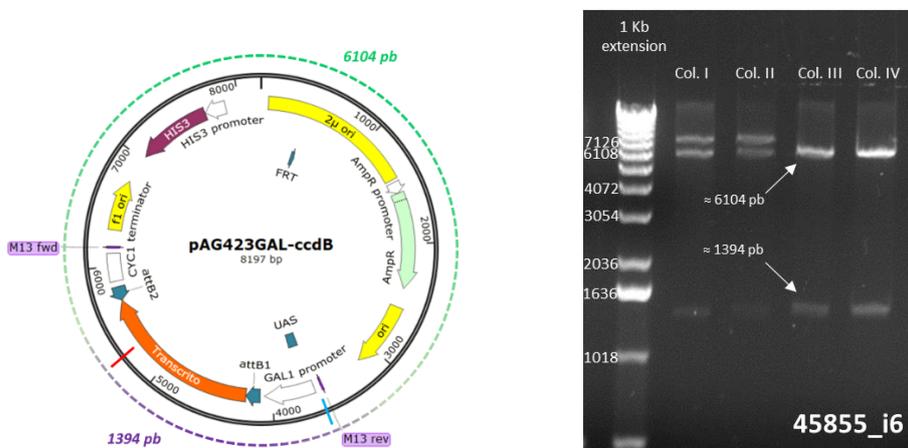
**Figura 32** – Esquema representativo da primeira etapa de clonagem (reação BP) dos três transcritos e suas colônias resultantes. As destacadas em vermelho foram as selecionadas para a próxima etapa (reação LR).

**Fonte:** elaborada pela autora.

Nesta etapa seguinte, tanto os clones de entrada selecionados quanto o vetor de destino pAG423GAL-ccdB foram inoculados em LB com meio seletivo para cada um, extraídos e quantificados. Para a reação LR, foram necessários 150 ng de cada vetor resultando nas concentrações e volumes apresentados na Tabela 6.

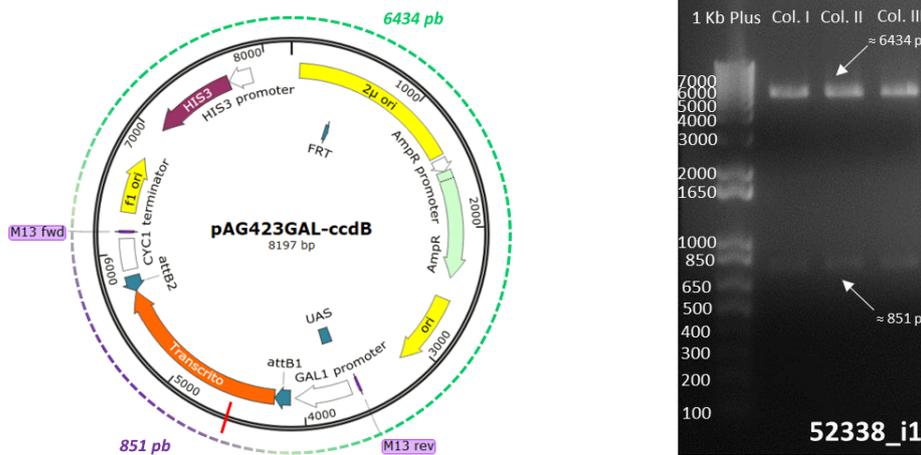
Da mesma forma que na reação BP, as misturas reacionais foram transformadas em *E. coli* com meio seletivo (LB + ampicilina) e várias colônias foram observadas na placa de Petri. Apenas 4 foram escolhidas arbitrariamente para cada transcrito e inoculadas em *shaker* a 37°C em LB líquido + ampicilina para extração do vetor pAG423GAL+transcrito.

Para verificar a eficiência da clonagem, estes vetores de expressão foram digeridos com as enzimas de restrição *SacI* para o 45855\_i6, *MluI* para o 52338\_i1 e *Clal* para o 52338\_i6, cujas reações também dividiram o plasmídeo em 2 fragmentos de tamanhos conhecidos e observados em eletroforese de gel de agarose 0,8% (Figuras 33, 34 e 35).



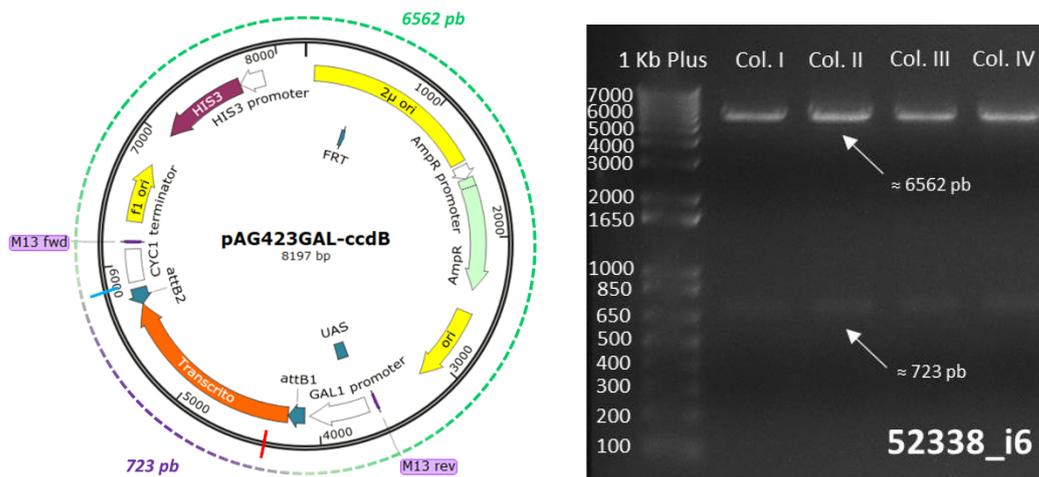
**Figura 33** – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pAG423GAL+45855\_i6 com a enzima de restrição *SacI*.

Fonte: elaborada pela autora.



**Figura 34** – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pAG423GAL+52338\_i1 com a enzima de restrição *MluI*.

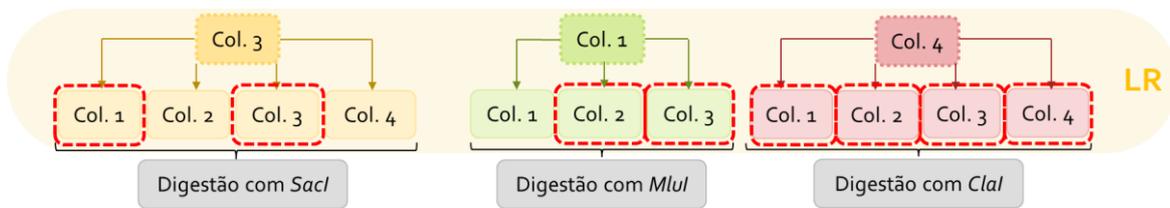
Fonte: elaborada pela autora.



**Figura 35** – Fragmentos gerados pela digestão do vetor pAG423GAL+52338\_i6 com a enzima de restrição *ClaI*.

Fonte: elaborada pela autora.

A escolha destas enzimas de restrição seguiu o mesmo critério da *BglII* e *HpaI* gerando os fragmentos com os seguintes tamanhos, 6104 pb e 1394 pb (*SacI*), 723 pb e 6562 pb (*ClaI*) e 851 pb e 6434 pb (*MluI*). A colônia 4 do transcrito 52338\_i1 não foi analisada pois não cresceu em LB + ampicilina. Para os transcritos 45855\_i6 e 5233\_i1 foram escolhidas duas colônias para sequenciamento e para o 52338\_i6 todas foram selecionadas (Figura 36).



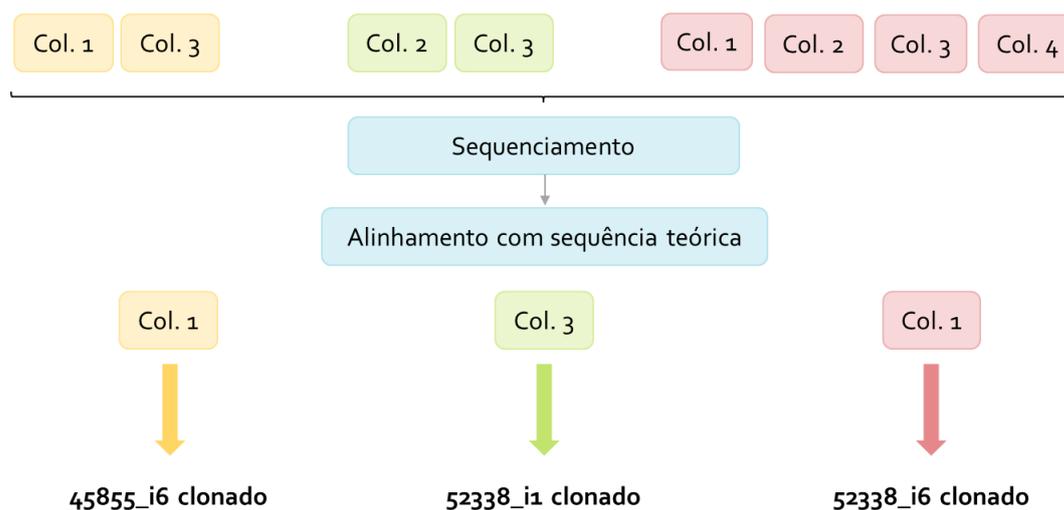
**Figura 36** – Esquema representativo da segunda etapa de clonagem (reação LR) dos três transcritos (45855\_i6, 52338\_i1 e 52338\_i6, respectivamente) e suas colônias resultantes. As destacadas em vermelho foram as selecionadas para o sequenciamento.

**Fonte:** elaborada pela autora.

### 5.2.7 Sequenciamento dos transcritos 45855\_i6; 52338\_i1 e 52338\_i6

Os dados do sequenciamento foram analisados no software *SeqScanner 2* (Thermo Fisher®) aplicando o *Phred20 Quality Score* (QV20+) como fator de qualidade confiável. De maneira geral, para cada base sequenciada, um valor é atribuído referente à sua qualidade. Foram consideradas fidedignas as bases com QV20+, ou seja, a probabilidade de uma base ser atribuída erroneamente é de 1 em 100, portanto, uma acurácia de 99% no sequenciamento (EWING; GREEN, 1998).

As sequências obtidas para cada primer utilizado nas reações (M13F, M13R e PM) foram alinhadas às sequências dos transcritos, inicialmente obtidas por meio da análise de bioinformática do transcriptoma. As Figuras 48, 49 e 50 presentes no ANEXO D representam os alinhamentos realizados para os transcritos 45855\_i6, 52338\_i1 e 52338\_i6 e suas respectivas colônias 1, 3 e 1 uma vez que os extraídos das outras selecionadas apresentaram mais inconsistências no alinhamento (Figura 37).



**Figura 37** – Esquema representativo das colônias de cada transcrito selecionadas para o sequenciamento e aquelas que se alinharam com a sequência teórica.

**Fonte:** elaborada pela autora.

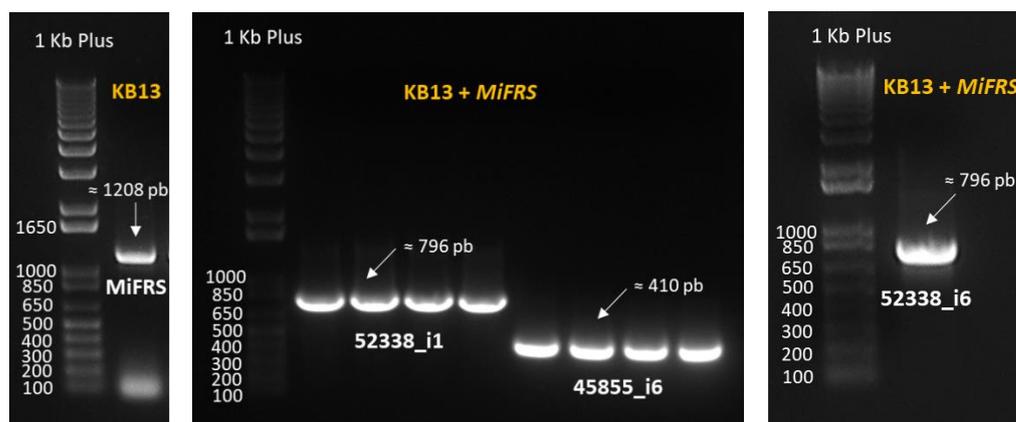
Como mencionado anteriormente e evidenciado nos alinhamentos do ANEXO D, os primers M13R e M13F sequenciarão o início e fim das sequências ao passo que o PM foi desenhado com base no transcrito 45855\_i6 para sequenciar a região central do mesmo.

Levando em consideração que as sequências obtidas por bioinformática são baseadas na montagem computacional do transcriptoma, algumas poucas alterações na sequência já eram esperadas, uma vez que se trata de uma comparação entre um dado computacional e um experimental. De toda sequência com 948 pb, apenas 6 pb não se alinharam corretamente no transcrito 45855\_i6. Já para os transcritos 52338\_i1 e 52338\_i6, ambos com 735 pb, apenas 3 pb e 9 pb não se alinharam, respectivamente (ANEXO D). Tais inconsistências podem ser provenientes de uma incoerência na montagem *De Novo* do transcriptoma ou mesmo de origens mutagênicas. Ainda assim, a elevada identidade observada entre as sequências teóricas e experimentais foi fundamental para a decisão da próxima etapa, a transformação e expressão em levedura destes transcritos.

#### 5.2.8 PCR de colônia: transcritos 45855\_i6, 52338\_i1 e 52338\_i6 e gene *MFRS*

Os produtos de PCR gerados com o protocolo da enzima *GoTaq G2 DNA Polymerase (colorless)* (Promega®) foram analisados em gel de eletroforese 0,8% e

os amplicons visualizados na Figura 38 corroboraram com os tamanhos indicados na Tabela 13 (item 4.2.9 em “Métodos”).



**Figura 38** – PCR de colônia de *MiFRS*, 45855\_i6, 52338\_i1 e 52338\_i6.

**Fonte:** elaborada pela autora.

Primeiramente, foi verificada a presença do gene de friedelina sintase de *M. ilicifolia* (*MiFRS*), referente à primeira transformação realizada em KB13 para o estoque do transformante de partida. Posteriormente, foi confirmada a existência dos três transcritos em levedura KB13+*MiFRS*, como indicado na figura acima. Dessa forma, tanto a PCR de colônia quanto o crescimento das colônias em meio de cultura seletivo demonstraram que o gene *MiFRS* e os transcritos (45855\_i6 ou 52338\_i1 ou 52338\_i6) foram eficientemente transformadas na linhagem KB13 de *S. cerevisiae*.

#### 5.2.9 Análise por CG-EM do extrato de levedura após indução

Como citado na descrição do procedimento, a partir de um inóculo *overnight*, três alíquotas foram tomadas para indução em triplicata. A decisão de realizar em replicata foi apenas para garantir que ao menos uma indução fosse bem sucedida não precisando repetir o experimento. Assim sendo, a Tabela 22 resume as amostras injetadas em CG-EM após indução e extração.

**Tabela 22** – Amostras separadas em pellet e meio de cultura injetadas no CG-EM em triplicata.

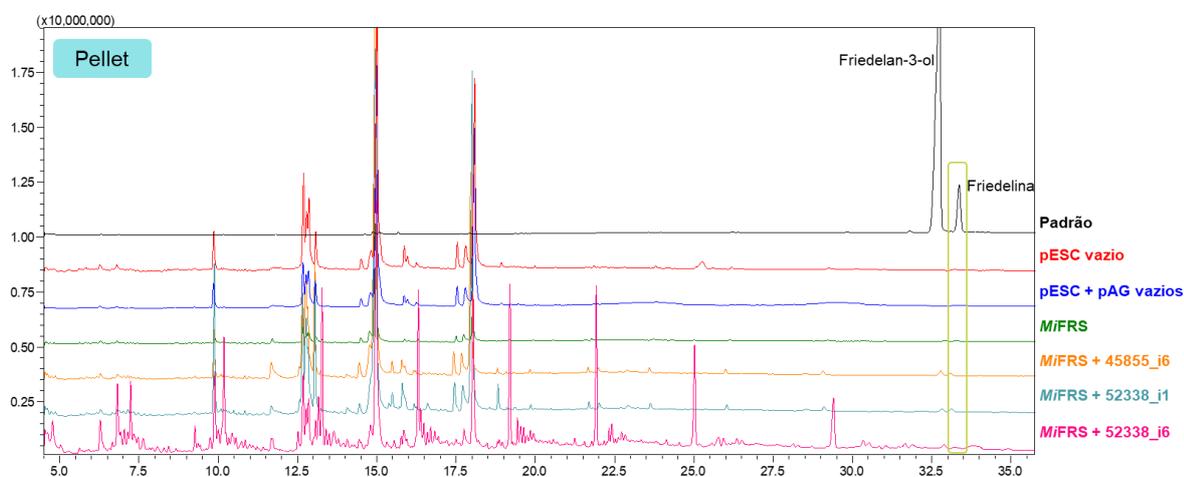
Amostra	Divisão	Replicatas	Divisão	Replicatas
pESC- <i>MiFRS</i>	Pellet	3	Meio	3
pESC- <i>MiFRS</i> + pAG-45855_i6	Pellet	3	Meio	3
pESC- <i>MiFRS</i> + pAG-52338_i1	Pellet	3	Meio	3

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

pESC-MiFRS + pAG-52338_i6	Pellet	3	Meio	3
pESC + pAG vazios	Pellet	3	Meio	3
pESC vazio	Pellet	2	Meio	2
Padrão Friedelina + Friedelan-3-ol	-	1	-	-

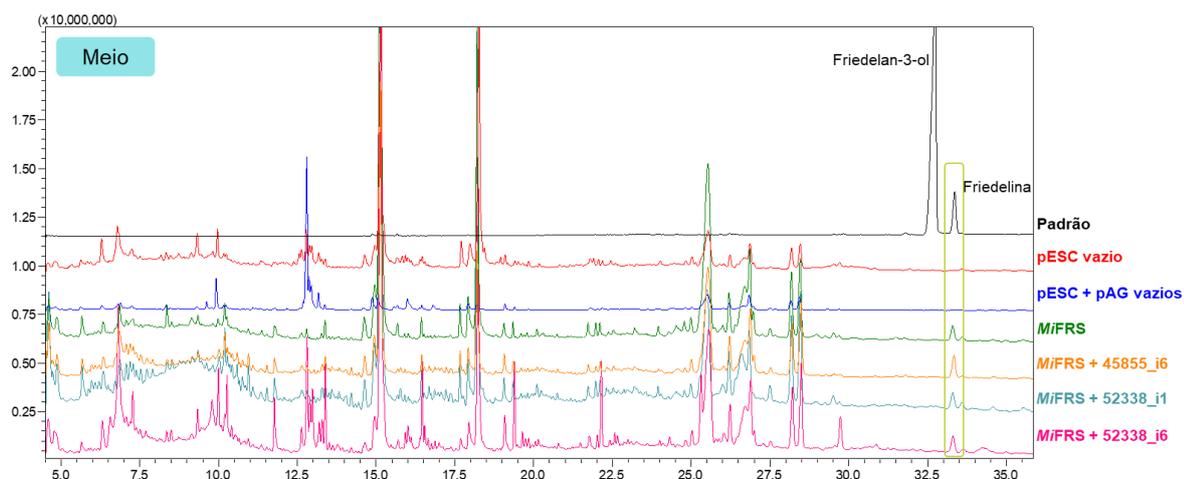
Fonte: elaborada pela autora.

As Figuras 39 e 40 a seguir destacam os cromatogramas obtidos para o pellet e meio de cultura, respectivamente. A ausência de picos referentes aos triterpenos nos cromatogramas dos pellets indica o quão eficiente foi o uso da M $\beta$ CD em extraí-los para o meio de cultura.



**Figura 39** – Cromatogramas dos pellets obtidos na extração dos plasmídeos vazios e dos contendo os transcritos em comparação com o padrão.

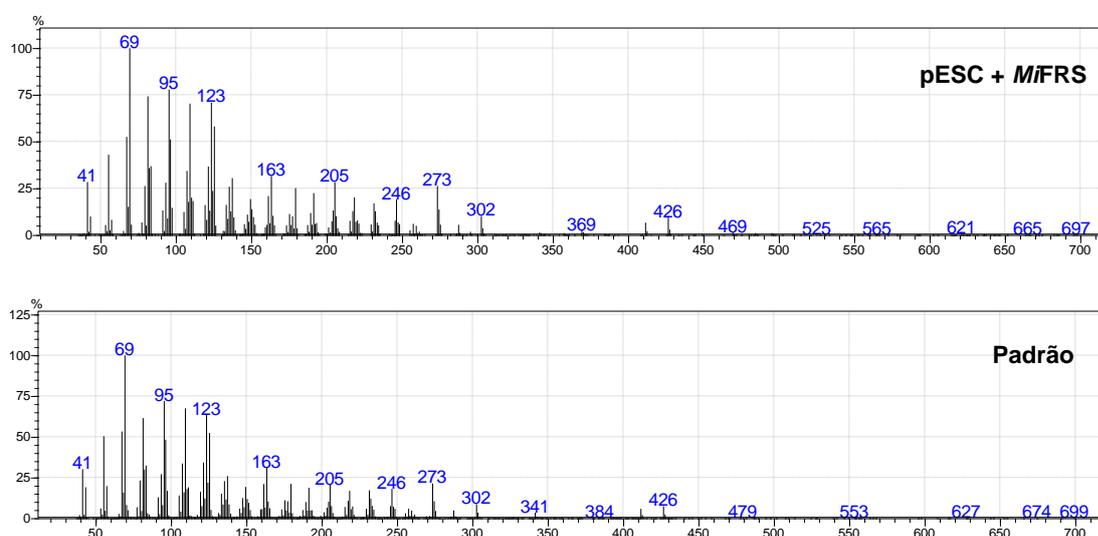
Fonte: elaborada pela autora.



**Figura 40** – Cromatogramas dos meios de cultura obtidos na extração dos plasmídeos vazios e dos contendo os transcritos em comparação com o padrão.

Fonte: elaborada pela autora.

Como já esperado, os cromatogramas referentes aos plasmídeos vazios (pESC e pESC + pAG vazios) não apresentaram picos em  $t_R = 32,75$  min e  $t_R = 33,36$  min, onde seria esperado a presença de friedelan-3-ol e friedelina, respectivamente (Figura 40). Da mesma forma, o cromatograma obtido pela indução da KB13 contendo o plasmídeo pESC-*MiFRS* apresentou um pico em  $t_R = 33,29$  min referente à friedelina produzida pelo gene da friedelina sintase. Tal identificação foi realizada por meio de comparação com os tempos de retenção do padrão Friedelina + Friedelan-3-ol e pelo índice de similaridade  $SI > 95$  obtido através da comparação entre os espectros de massas obtidos e os presentes na base de dados da NIST (Figura 41).



**Figura 41** – Espectros de massas da friedelina produzida pelo gene *MiFRS* e do padrão.

**Fonte:** elaborada pela autora.

Entretanto, os cromatogramas referentes à indução da KB13 contendo tanto o plasmídeo pESC-*MiFRS* quanto os pAGs com os transcritos (45855\_i6, 52338\_i1, 52338\_i6) apenas apresentaram o pico referente à friedelina devido ao pESC-*MiFRS* presente. Nenhum pico em  $t_R = 32,75$  min referente à presença de friedelan-3-ol foi encontrado em nenhum dos três cromatogramas.

Tal resultado sugere duas possibilidades. Uma delas pode estar relacionada com a tradução destes transcritos. É possível que os transcritos clonados e transformados em levedura não estejam sendo traduzidos em suas proteínas correspondentes pelo sistema heterólogo. Para confirmação, seria necessário incluir uma cauda de histidina na sequência para realização do experimento de *western blot*. Contudo, Bicalho e colaboradores (BICALHO *et al.*, 2019), clonaram,

transformaram e induziram a expressão da CYP712K4 com sucesso sem a necessidade de incluir a cauda de histidina.

Levando em consideração que todo o presente trabalho foi reproduzido da mesma maneira que publicado por (BICALHO *et al.*, 2019), incluindo o uso da tecnologia Gateway para clonagem, a mesma linhagem de levedura (KB13) e os mesmos plasmídeos (pESC-URA-tHMG1-DEST e pAG423GAL-ccdB) foram empregados bem como as mesmas técnicas de indução por galactose e extração dos metabólitos, acredita-se que uma segunda possibilidade para não produção de friedelan-3-ol seja mais plausível. É possível que os transcritos selecionados realmente não sejam os responsáveis por tal redução na posição C-3 de friedelina e que outro transcrito ou até mesmo outra subclasse de enzimas SDR possa estar relacionada com a reação enzimática em questão.

De qualquer forma, acredita-se que exista uma enzima em plantas que seja homóloga ao ERG27 em fungos e ao HSD17B7 em vertebrados que faz essa redução em C-3 e o presente estudo já é um grande material de partida para pesquisas futuras que têm como objetivo a busca por tal enzima. Sabe-se que além de *M. ilicifolia*, outras espécies de plantas também contêm em sua composição química, friedelan-3-ol e friedelina e se beneficiariam de tal descoberta. As espécies do gênero *Quercus* (Fagaceae), são as que mais se destacam quando se trata de ambos os metabólitos de interesse. Entretanto, existem muitas outras espécies das mais variadas famílias, como pode ser visto na Quadro 3 a seguir:

**Quadro 3** – Espécies que contêm friedelina e friedelan-3-ol em sua composição química

<b>Espécie</b>	<b>Família</b>
<i>Bischofia javanica</i>	Phyllanthaceae
<i>Calophyllum amoenum</i>	Calophyllaceae
<i>Castanea caudata</i>	Fagaceae
<i>Castanopsis cuspidata</i>	Fagaceae
<i>Clusia ellipticifolia</i>	Clusiaceae
<i>Dalea tuberculata</i>	Fabaceae
<i>Fagus crenata</i>	Fagaceae
<i>Fagus japonica</i>	Fagaceae
<i>Flueggea microcarpa</i>	Phyllanthaceae
<i>Glochidon puberum</i>	Phyllanthaceae
<i>Guazuma tomentosa</i>	Malvaceae
<i>Isocoma wrightii</i>	Asteraceae
<i>Pasania edulis</i>	Fagaceae
<i>Rhododendron degronianum</i>	Fagaceae

Fonte: (GLASBY, 2005).

Baseado nessas informações, o reconhecimento do gene que codifica a enzima redutase não contribuirá somente ao estudo biossintético da espécie *M. ilicifolia*, mas sim ao de pelo menos 15 outras espécies que contêm friedelina e friedelan-3-ol em seu metabolismo. Considerando a existência de outros terpenos cetônicos em C-3, esse número pode atingir valores mais elevados e abrangentes, podendo englobar uma grande variedade de espécies vegetais, contribuindo sobremaneira para a elucidação dessa rara rota biossintética que envolve o mecanismo de oxidação/redução em C-3 de alguns esqueletos triterpênicos.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho abordou a busca de uma enzima redutase responsável por reduzir o grupo cetônico na posição C-3 da molécula de friedelina em álcool na molécula de friedelan-3-ol, ambas substâncias presentes no extrato de baixa polaridade das folhas de *Maytenus ilicifolia*.

A busca e a descoberta de tal enzima seriam extremamente relevantes na área de biossíntese de produtos naturais visto que contribuiriam na determinação de várias rotas biossintéticas de plantas que apresentam em sua composição terpenos cetônicos na posição C-3 e seus derivados reduzidos.

Além de *M. ilicifolia*, outras espécies de plantas também contêm em sua composição química, friedelan-3-ol e friedelina. As espécies do gênero *Quercus* (Fagaceae) se destacam quando se trata de ambos os metabólitos de interesse. Baseado nessas informações, a análise cruzada do transcriptoma de *Quercus suber* com o transcriptoma de *Maytenus ilicifolia*, juntamente com o alinhamento da biblioteca formada por enzimas 3-ceto redutase, possibilitou reduzir o número de transcritos prováveis para 3, uma vez que o objetivo dessa abordagem foi justamente afunilar os transcritos buscando aqueles comuns nas duas espécies produtoras dos metabólitos de interesse.

Estes transcritos prováveis apresentaram motifs conservados característicos de *Short-Chain Dehydrogenase/Reductase* (SDR), grupo de enzimas que engloba as enzimas 3-ceto redutase, sendo a redução em C-3, uma de suas funções e, portanto, um forte indício de que os transcritos codificariam uma enzima que reduziria friedelina em friedelan-3-ol.

Por sua vez, a transformação em levedura geneticamente modificada e sua indução por galactose utilizando metil- $\beta$ -ciclodextrina possibilitou detectar apenas friedelina no meio de cultura através da análise por CG-EM. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que os transcritos selecionados não codificam uma enzima capaz de reduzir friedelina em friedelan-3-ol. De qualquer forma, não se exclui a possibilidade de que outro transcrito presente no transcriptoma possa ser o responsável por essa redução, seja ele codificador de uma enzima do tipo 3-ceto redutase ou de outra subclasse de SDR.

Outra importante contribuição científica deste trabalho reside na análise comparativa dos transcriptomas dos tecidos foliar e radicular o que demotra maiores níveis de expressão nas folhas, corroborando o acúmulo de friedelina e friedelan-3-ol nas partes aéreas de *M. ilicifolia*.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, T. B. *et al.* Friedelin in *Maytenus ilicifolia* is produced by friedelin synthase isoforms. **Molecules**, v. 23, n. 700, p. 1–12, 2018.
- ANTONISAMY, P. *et al.* Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 750, p. 167–175, 2015.
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1070–1077, 2011.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Fundação Oswaldo Cruz, 2010. v. 2
- AROSO, I. M. *et al.* Cork: current technological developments and future perspectives for this natural, renewable, and sustainable material. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 12, p. 11130–11146, 2017.
- BICALHO, K. U. *et al.* CYP712K4 catalyzes the C-29 oxidation of friedelin in the *Maytenus ilicifolia* quinone methide triterpenoid biosynthesis pathway. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 11, p. 2510–2522, 2019.
- BIOINFORMATICS. **Primer 3 Plus**. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>>. Acesso em: 1 dez. 2020.
- BIRAL, L.; LOMBARDI, J. A. **Celastraceae - Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB605053>>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- CHRISTENHUSZ, M. J. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201–217, 2016.
- CORSINO, J. *et al.* Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 741–748, 2000.
- CORSINO, J. **Estudo químico e biossintético em *Maytenus aquifolium* (Celastraceae)**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Química - UNESP Araraquara, 2001.
- DAS, J.; SARKAR, A.; GHOSH, P. Friedelane triterpenoids: transformations toward A-ring modifications including 2-homoderivatives. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 6673–6688, 2018.
- DESMOND, E.; GRIBALDO, S. Phylogenomics of sterol synthesis: insights into the origin, evolution, and diversity of a key eukaryotic feature. **Genome Biology and Evolution**, v. 1, p. 364–381, 2009.
- DEVI, K. *et al.* Genome wide transcriptome profiling reveals differential gene expression in secondary metabolite pathway of *Cymbopogon winterianus*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–11, 2016.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. Chichester:

John Wiley & Sons, Ltd, 2009. v. 53

DOBROWOLSKI, P. *et al.* Can 2-oxoglutarate prevent changes in bone evoked by omeprazole? **Nutrition**, v. 29, n. 3, p. 556–561, 2013.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, n. 8, p. 186–194, 1998.

FERREIRA, P. M. *et al.* A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. **Planta**, v. 219, n. 2, p. 319–324, 2004.

GAO, J.-M. *et al.* The dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 5, p. 1153–1189, 2007.

GERLACH, A. C. L. *et al.* The use of anisaldehyde sulfuric acid as an alternative spray reagent in TLC analysis reveals three classes of compounds in the genus *Usnea* Adans. (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota). **Preprints**, p. 1–9, 2018.

GHOSH, S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–15, 2017.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 31–34, 2007.

GLASBY, J. S. **Dictionary of Plants Containing Secondary Metabolites**. Londres: Taylor & Francis, 2005.

GOMES, A. R. *et al.* An overview of heterologous expression host systems for the production of recombinant proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 4, p. 346–356, 2016.

GONZÁLEZ, A. G. *et al.* Ethnobotanical uses of Celastraceae. Bioactive metabolites. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 23, p. 649–738, 2000.

GONZALEZ, F. G. *et al.* Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 41–47, 2001.

GUNATILAKA, A. A. L. Triterpenoid quinonamethides and related compounds (celastroids). In: **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 67**. 1. ed. Viena: Springer-Verlag Wien, 1996. p. 176.

GUO, J. *et al.* Research progress and future development trends in medicinal plant transcriptomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. July, p. 1–10, 2021.

HAAS, B. J. *et al.* *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1494–1512, 2013.

HAAS, B. J. **Trinity Transcript Quantification**. Disponível em: <<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/Trinity-Transcript-Quantification>>. Acesso em: 12 jan. 2022.

HAN, J. Y. *et al.* Functional characterization of an oxidosqualene cyclase (PdFRS) encoding a monofunctional friedelin synthase in *Populus davidiana*. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 95–111, 2018.

- HERNANDES, C. *et al.* Anticancer activities of the quinone-methide triterpenes maytenin and 22- $\beta$ -hydroxymaytenin obtained from cultivated *Maytenus ilicifolia* roots associated with down-regulation of miRNA-27a and miR-20a/miR-17-5p. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 1–19, 2020.
- HÖRMANN, F. *et al.* Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34756–34762, 2004.
- HSIEH, P.-H.; OYANG, Y.-J.; CHEN, C.-Y. Effect of *de novo* transcriptome assembly on transcript quantification. **bioRxiv**, 2018.
- HUANG, B. *et al.* Heterologous production of secondary metabolites as pharmaceuticals in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1121–1137, 2008.
- INVITROGEN. Gateway Technology with Clonase II. **User Guide**, p. 74, 2012.
- JIN, J. *et al.* Astertarone A synthase from chinese cabbage does not produce the C4-epimer: mechanistic insights. **Organic Letters**, v. 20, p. 1802–1805, 2018.
- JUDD, W. S. *et al.* **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2002.
- KEGG. **Enzymes - *Saccharomyces cerevisiae***. Disponível em: <[https://www.genome.jp/kegg-bin/get\\_htext?sce01000+YLR100W](https://www.genome.jp/kegg-bin/get_htext?sce01000+YLR100W)>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- KUETE, V. *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 372–379, 2007.
- KUSCHEL, M.; AUSSERER, W. Characterization of RNA quality using the Agilent 2100 Bioanalyzer. **Agilent Technologies**, p. 1–4, 2000.
- KUSHIRO, T.; EBIZUKA, Y. Triterpenes. In: **Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 673–708.
- LAM, J. R. *et al.* Proton pump inhibitor and histamine 2 receptor antagonist use and vitamin B 12 deficiency. **Jama**, v. 310, n. 22, p. 2435–2442, 2013.
- LEITE, J. P. V. *et al.* Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 2, p. 248–254, 2010.
- LI, J. J. *et al.* Anti-cancer effects of pristimerin and the mechanisms: a critical review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–10, 2019.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1998.
- LU, S. *et al.* CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, p. D265–D268, 2020.
- LUO, Y. *et al.* Engineered biosynthesis of natural products in heterologous hosts. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 15, p. 5265–5290, 2015.
- MCDONALD, A. G.; BOYCE, S.; TIPTON, K. F. ExplorEnz: The primary source of the IUBMB enzyme list. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D593–D597, 2009.

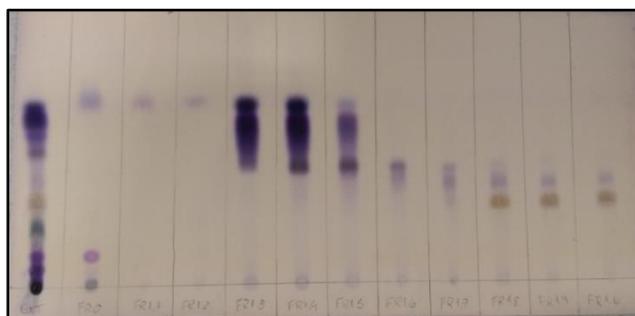
- MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171–175, 2002.
- MOSER, S.; PICHLER, H. Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 5501–5516, 2019.
- MOSES, T. *et al.* Bioengineering of plant (tri) terpenoids: from metabolic engineering of plants to synthetic biology *in vivo* and *in vitro*. **New Phytologist**, v. 200, p. 27–43, 2013.
- MOSSI, A. J. *et al.* Extraction and characterization of volatile compounds in *Maytenus ilicifolia*, using high-pressure CO<sub>2</sub>. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 168–178, 2004.
- MOUMMOU, H. *et al.* The Plant Short-Chain Dehydrogenase (SDR) superfamily: Genome-wide inventory and diversification patterns. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 219, p. 1–17, 2012.
- NC-IUBMB. The Enzyme List: Class 1 — Oxidoreductases. **ExplorEnz**, p. 443, 2010.
- NCBI. **3-keto steroid reductase, classical (c) SDRs**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=cd08941>>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- NEW ENGLAND BIOLABS, N. **Restriction Endonucleases**. Disponível em: <<https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases>>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- O'CONNOR, C. M. **Investigations in Molecular Cell Biology**. 1. ed. Boston: LibreTexts Project, 2021.
- PATRO, R. *et al.* Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature Methods**, v. 14, n. 4, p. 417–419, 2017.
- PEREIRA-LEAL, J. B. *et al.* A comprehensive assessment of the transcriptome of cork oak (*Quercus suber*) through EST sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 371, 2014.
- PESSUTO, M. B. *et al.* Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 412–416, 2009.
- PROMEGA. GoTaq G2 DNA Polymerase Protocol. n. March, p. 1–2, 2018.
- QUEIROGA, C. L. *et al.* Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3-ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 465–468, 2000.
- SANTONI, M. M. *et al.* Comparative transcriptome profiling of *Maytenus ilicifolia* root and leaf. **Advances in Bioinformatics and Computational Biology**, v. 1, p. 3–14, 2021.
- SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 650–659, 2009.
- SCIENTIFIC, T. F. NanoDrop Spectrophotometers. **T042 - Technical Bulletin**, p. 2, 2019a.
- SCIENTIFIC, T. F. **Assessing RNA Quality**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references>>. Acesso em: 10 jun. 2019b.
- SHAN, W. G. *et al.* Natural friedelanes. **Chemistry and Biodiversity**, v. 10, n. 8, p. 1392–1434, 2013.

- SHI, J. *et al.* Celastrol: a review of useful strategies overcoming its limitation in anticancer application. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, n. November, 2020.
- SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Celastraceas: Fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1205–1220, 2014.
- SOUZA-MOREIRA, T. M. *et al.* Friedelin synthase from *Maytenus ilicifolia*: leucine 482 plays an essential role in the production of the most rearranged pentacyclic triterpene. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.
- TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract. Part I - preclinical studies. **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 915–920, 2017a.
- TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and toxicological study of *Maytenus ilicifolia* leaf extract Part II—clinical study (Phase I). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 921–926, 2017b.
- TARAMINO, S. *et al.* Interactions of oxidosqualene cyclase (Erg7p) with 3-keto reductase (Erg27p) and other enzymes of sterol biosynthesis in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, n. 2, p. 156–162, 2010.
- THERMO SCIENTIFIC. FastDigest BgIII. p. 1–4, 2012.
- THUY, T. T.; CUONG, N. H.; SUNG, T. VAN. Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth. **Journal of Chemistry**, v. 45, p. 373–376, 2007.
- UMATE, P. Comparison of genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants to orthologs in yeast. **Rice Research**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2015.
- VELOSO, C. C. *et al.* Pharmacological potential of *Maytenus* species and isolated constituents, especially tingenone, for treatment of painful inflammatory diseases. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 4, p. 533–540, 2017.
- VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; CERVI, A. C. High resolution gas chromatography analysis of 'espinheira santa' (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*): Analysis of crude drug adulterations. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 4, p. 241–244, jun. 1994.
- WANG, Z. *et al.* Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases from *Kalanchoe daigremontiana*: Enzymes catalyzing up to 10 rearrangement steps yielding friedelin and other triterpenoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 29703–29712, 2010.
- ZHU, Y. *et al.* Identification of genes involved in celastrol biosynthesis by comparative transcriptome analysis in *Tripterygium wilfordii*. **Phyton**, v. 91, n. 2, p. 279–291, 2022.

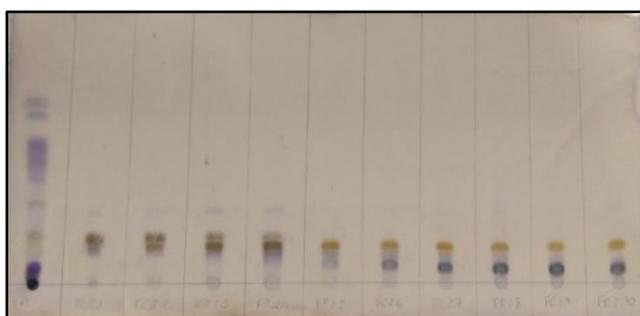
## ANEXOS

## ANEXO A

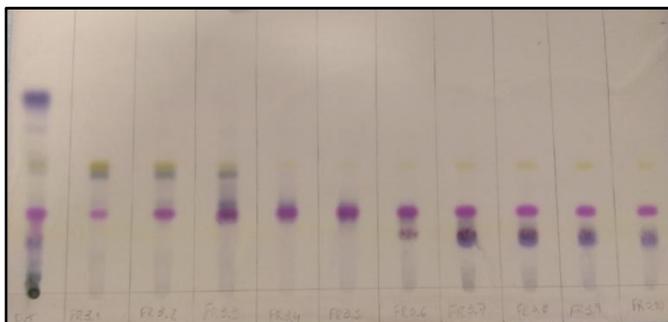
*Placas cromatográficas referentes ao fracionamento do extrato de baixa polaridade*



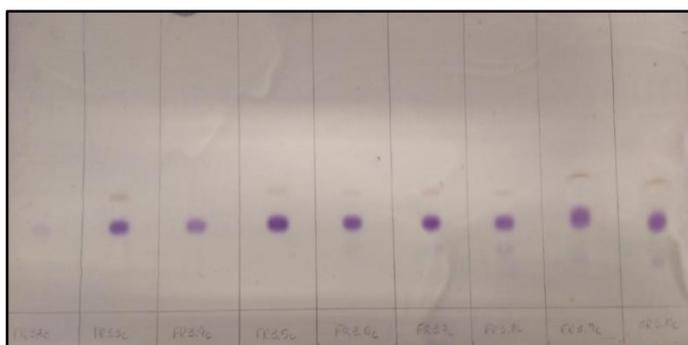
**Figura 42** – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente às frações FR1. Fase móvel: Hex/AcOEt 98:02.



**Figura 43** – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente às frações FR2. Fase móvel: Hex/AcOEt 95:05.



**Figura 44** – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente às frações FR3. Fase móvel: Hex/AcOEt 90:10.



**Figura 45** – Placa cromatográfica revelada com anisaldeído referente aos precipitados das frações FR3. Fase móvel: Hex/AcOEt 90:10.

**ANEXO B***Protocolos***Extração RNA total (kit RNeasy Plant Mini kit)**

1. Com o auxílio de nitrogênio líquido e almofariz, moer 100 g de folhas.
2. Transferir o tecido triturado para um microtubo de 2 mL contendo 450  $\mu$ L tampão RLT (tampão de lise) com  $\beta$ -mercaptoetanol (desnatura RNases liberadas no processo de lise) na proporção 1 ml:10  $\mu$ L.
3. Vortexar e transferir o lisado para uma coluna lilás QIAshredder (remove material insolúvel) contendo tubo coletor de 2 mL. Centrifugar por 2 min na velocidade máxima.
4. Transferir o sobrenadante do *flow-through* para outro microtubo contendo meio volume de etanol 100% (auxilia na precipitação de ácidos nucleicos e promove ligação do RNA na membrana da coluna) e homogeneizar brevemente.
5. Transferir a amostra para uma coluna RNeasy Mini contendo tubo coletor de 2 mL. Centrifugar por 30 s a 10.000 rpm. Descartar o *flow-through*.
6. Adicionar 700  $\mu$ L do tampão RW1 (tampão de lavagem: remove biomoléculas tais como carboidratos, proteínas e ácidos graxos) à coluna. Centrifugar por 15 s a 10.000 rpm. Descartar o *flow-through*.
7. Adicionar 500  $\mu$ L do tampão RPE (tampão de lavagem: remove traços de sais) à coluna. Centrifugar por 15 s a 10.000 rpm. Descartar o *flow-through*.
8. Repetir o passo anterior.
9. Centrifugar a coluna por 1 min na velocidade máxima para secagem da membrana.
10. Transferir a coluna para microtubo de 1,5 mL. Adicionar 30  $\mu$ L de água *RNase free* e centrifugar por 1 min na velocidade máxima para eluição do RNA.

**Tratamento do RNA com DNase I**

Para tratar até 5  $\mu$ g de RNA, diluir o RNA para 8  $\mu$ L de água

1. Adicionar 1  $\mu$ L de *Reaction Buffer*
2. Adicionar 1  $\mu$ L de DNase I
3. Deixar reagir por 15 min na temperatura ambiente
4. Adicionar 1  $\mu$ L de *Stop Solution*
5. Incubar por 10 min a 70°C.

Volume final de reação: 11  $\mu$ L.

**Transcrição Reversa (kit *High Capacity*)**

1. Ajustar o volume para 35  $\mu$ L
2. Preparar o MIX de reação

<b>Reagente</b>	<b>Volume</b>
Tampão 10x	5 $\mu$ L
dNTPs (100 mM)	2 $\mu$ L
Primers randômicos (10x)	5 $\mu$ L
Enzima (Multiscribe R.T.)	3 $\mu$ L

3. Distribuir 15  $\mu$ L do MIX por amostra.
4. Incubar com a seguinte programação

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 min
4°C	...

Volume final da reação: 50  $\mu$ L (quantidade final de cDNA: 100 ng/ $\mu$ L).



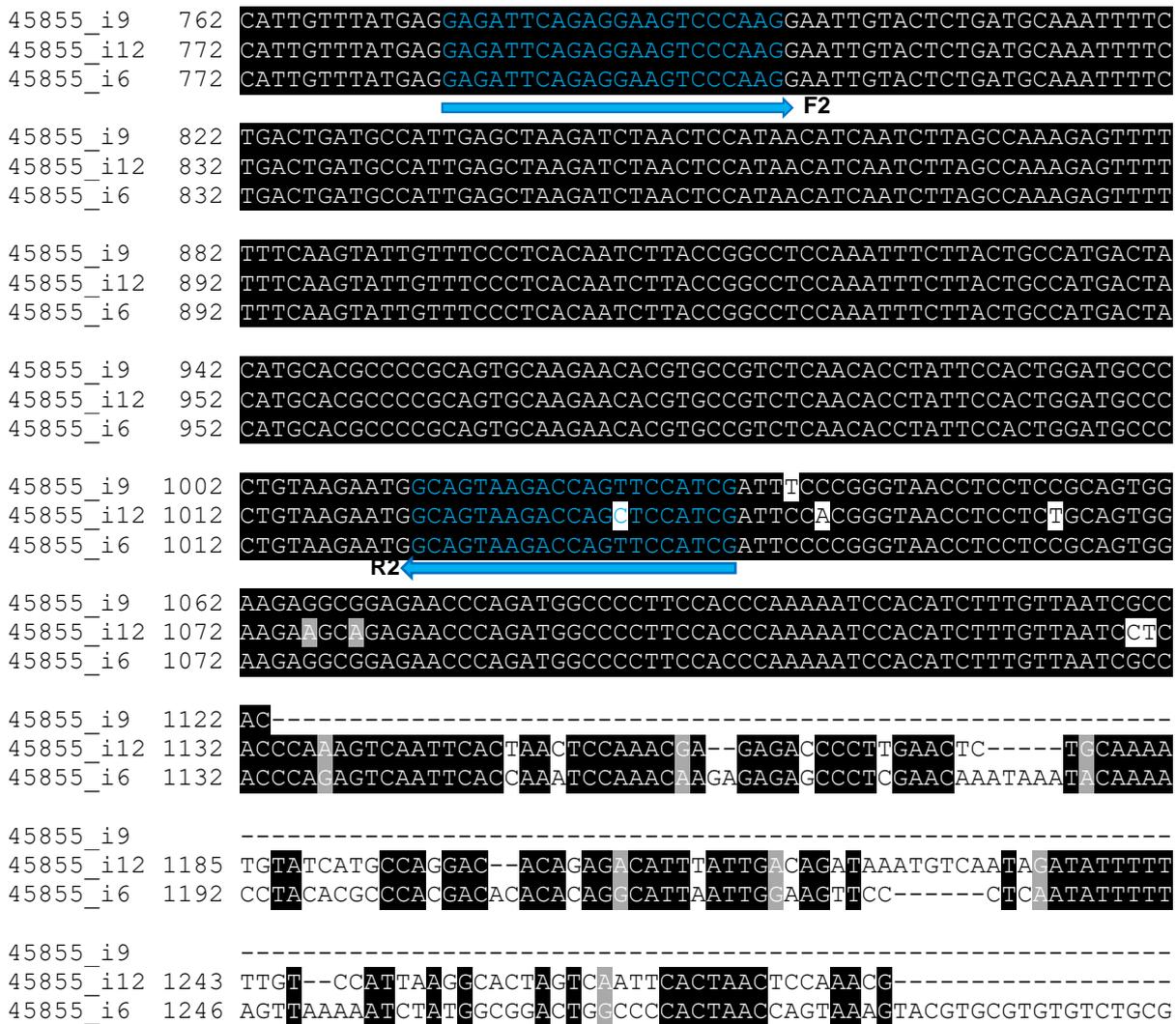
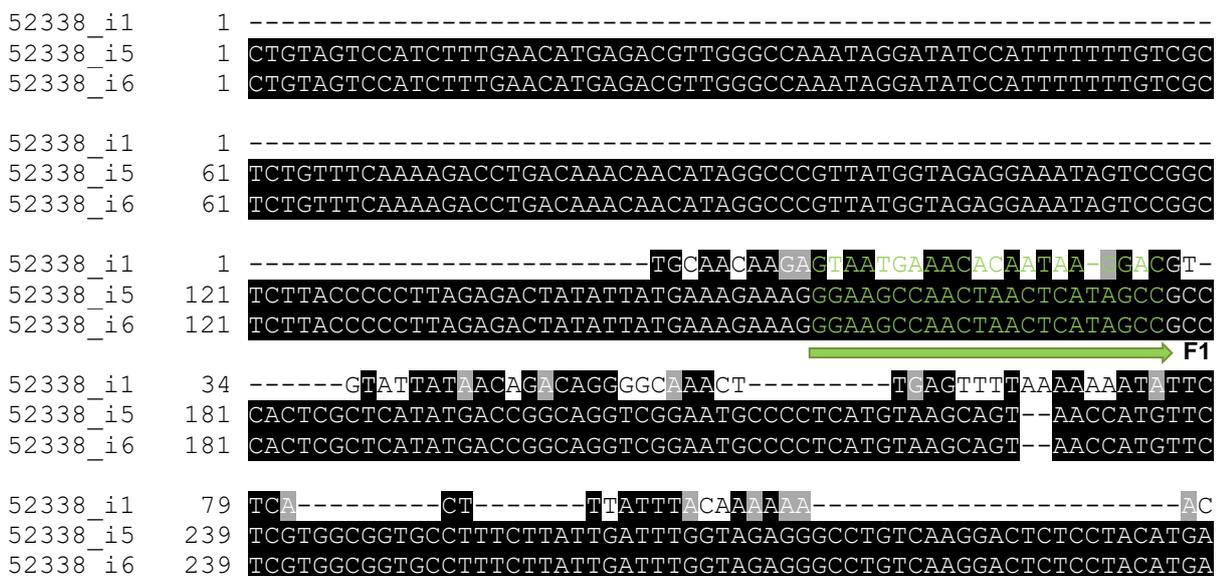


Figura 46 – Alinhamento múltiplo e design dos pares de primers para os transcritos 45855.



52338\_i1 100 CAAGATCT-----GGGTAC--CTGTAGGGAA-----GAAAAA  
52338\_i5 299 AAGGATCTGAGGCAATATCTACAGTAATGGGCCTCTCTGTTGAACAGATTATACGATAAA  
52338\_i6 299 AAGGATCTGAGGCAATATCTACAGTAATGGGCCTCTCTGTTGAACAGATTATACGATAAA

52338\_i1 130 T-----ATTTTCCTGAACCCAAATTCTAACAGTATAAAAATTGGGTACCTAGAGG-  
52338\_i5 359 AATTCATATTAATTTTCACAATTCAGATT-----TATTATAAGTTACATAGAAAA  
52338\_i6 359 AATTCATATTAATTTTCACAATTCAGATT-----TATTATAAGTTACATAGAAAA

52338\_i1 180 -----TAATT-----TCCAAAAGATTCATATAGCTTGGTTTTCTTATTAAGTTATT  
52338\_i5 410 AGAAATCATTATCGCTCATCACTATTGAATATTGAAGCTTGGTTTTCTTATTAAGTTATT  
52338\_i6 410 AGAAATCATTATCGCTCATCACTATTGAATATTGACGCTTGGTTTTCTTATTAAGTTATT

52338\_i1 226 ATGGGTTTCTTACCAGATACGGGCTATGGGCTTTCATATTTTTTGGGCTTTCTTCCATA  
52338\_i5 470 ATGGGTTTCTTACCAGATATGGGCTACGGGCTTTCATATTTTTTGGGCTTTCTTC---  
52338\_i6 470 ACGGGTTTCTTACCAGAT-TGGGCTACGGGCTTTCATATTTTTTGGGCTTTCTTC---

52338\_i1 286 TGGGTTTCTTAGCGGCTATAGGCTCACTCATGTGGCTTAAGAAATTATATGTAAATTCAT  
52338\_i5 527 -----TTAGGGGCTGTAGGCTCACTCATGTGGCTTAAGAAATTATATGTACATATA  
52338\_i6 526 -----TTAGGGGCTGTAGGCTCACTCATGTGGCTTAAGAAATTATATGTACATATA

52338\_i1 346 CCATTTTTTTTTAATAAGAGTTTATGTGTACACATGATTTACTTGATGAGATTCATGGTGA  
52338\_i5 579 -----TTTTGTTATAAAAAGTTTCATGCGTCACATGATTTACTTGATGAGATTCATGGTGA  
52338\_i6 578 -----TTTTGTTATAAAAAGTTTCATGCGTCACATGATTTACTTGATGAGATTCATGGTGA

52338\_i1 406 AATCCCAGAGCTTCTTGCCATGCCAGGGTCCTTAGCCTTGGCGGCTTTTTCTGGCCAAAT  
52338\_i5 634 AATCCCAGAGCTTCTTGCCAAAGTCAGGGTCCTTAGCCTTGGCGGCTTTTTCTGGCCAAAT  
52338\_i6 633 AATCCCAGAGCTTCTTGCCAAAGTCAGGGTCCTTAGCCTTGGCGGCTTTTTCTGGCCAAAT

52338\_i1 466 TACAGTCTGCAAAATACGCACCACTTGTCCCTTCCAATTGCGGATGCAAAGCCACGTAAC  
52338\_i5 694 TACAGTCTGCAAAATACGCACCACTTGTCCCTTCCAATTGCGGATGCAAAGCCACGTAAC  
52338\_i6 693 TACAGTCTGCAAAATACGCACCACTTGTCCCTTCCAATTGCGGATGCAAAGCCACGTAAC

R1 ←

52338\_i1 526 AAGTTGTCGCAGCTCCCTGCTGCACATTTTTAAACACATATTTACCGACCCTATCCACAA  
52338\_i5 754 AAGTTGTCGCAGCTCCCTGCTGCACATTTTTAAACACATATTTACCGACCCTATCCACAA  
52338\_i6 753 AAGTTGTCGCAGCTCCCTGCTGCACATTTTTAAACACATATTTACCGACCCTATCCACAA

52338\_i1 586 TGCCGTTAAAAGTGCGGTAATGACGGAAGATGTTGGTCTTTATCACTCCTGGATGAACAG  
52338\_i5 814 TGCCGTTAAAAGTGCGGTAATGACGGAAGATGATTGTCTTTATCACCCCTGGATGAATAG  
52338\_i6 813 TGCCGTTAAAAGTGCGGTAATGACGGAAGATGTTGGTCTTTATCACTCCTGGATGAACAG

52338\_i1 646 AATTTGCAGTTATATTTACCCCTTCTTCTGTTCAAACAAGAGCCAACATAGTGAAAAGT  
52338\_i5 874 AATTTGCAGTTATATTTACCCCTTCTTCT-----  
52338\_i6 873 AATTTGCAGTTATATTTACCCCTTCTTCTGTTCAAACAAGAGCCAACATAGTGAAAAGT

52338\_i1 706 TCCACAGCGTAACAACAACAAGAGTTTCTTTTTCACTTTTTTTCCCGAGGCGTAGTAT  
52338\_i5 904 -----  
52338\_i6 933 TCCACAGCGTAACAACAACAAGAGTTTCTTTTTCACTTTTTTTCCCGAGGCGTAGTAT

52338\_i1 766 GAGCACTATTCGACGCAGAACACTCGATCGCTCTATTTTTGAGAATGAAGACTCCTGCCT  
52338\_i5 904 -----  
52338\_i6 993 GAGCACTATTCGACGCAGAACACTCGATCGCTCTATTTTTGAGAATGAAGACTCCTGCCT

→ F2

52338\_i1 826 TCAGATT-TTTTGAAGCTGATTAGCATGCAAAACATTAGCAAGCTTTGACTGTCCATAT  
52338\_i5 904 TCAGATTTTTTGAAGCTGATTAGCATGCAAAACATTAGCAAGCTTTGACTGTCCATAT  
52338\_i6 1053 TCAGAT-TTTTGAAGCTGATTAGCATGCAAAACATTAGCAAGCTTTGACTGTCCATAT

52338\_i1 885 GCAAGAGGTCCCATGTACCCAGATGGATCATTGATTTTATCAAACGAATTCCTTCACAA  
52338\_i5 964 GCAAGAGGTCCCATGTACCCAGATGGATCATTGATTTTATCAAACGAATTCCTTCACAA  
52338\_i6 1112 GCAAGAGGTCCCATGTACCCAGATGGATCATTGATTTTATCAAACGAATTCCTTCACAA

52338\_i1 945 TAAGTCAACCGATGACCCCATGAGGCGACATTAACAATTCTTCTTCTTATTACTGTTA



## ANEXO D

*Alinhamentos das colônias com as sequências teóricas*

M13F	1	-----
M13R	1	ATG TGGATTTTGGGTGGAAGGGGCCATCTGGGTCTCCGCCTCTTCCACTGCGGAGGAG
i6	1	ATG TGGATTTTGGGTGGAAGGGGCCATCTGGGTCTCCGCCTCTTCCACTGCGGAGGAG
PM	1	-----
M13F	1	-----
M13R	61	GTTACCTGGGAATCATGGAAGTGGTCTTACTGCCATTCTTACAGGGGCATCCAGTGG
i6	61	GTTACCTGGGAATCATGGAAGTGGTCTTACTGCCATTCTTACAGGGGCATCCAGTGG
PM	1	-----
M13F	1	-----
M13R	120	ATAGGTGTTGAGACGGCACGTGTTCTTGCACCTGCGGGGCGTCATGTAGTCATGGCAGTA
i6	121	ATAGGTGTTGAGACGGCACGTGTTCTTGCACCTGCGGGGCGTCATGTAGTCATGGCAGTA
PM	1	-----CTGCGGGGCGTCATGTAGTCATGGCAGTA
M13F	1	-----
M13R	180	A-----
i6	181	AGAAATTTGGAGCCGTAAGATTGTGAGGAAACAATACTTGAAAAAACTCTTTGGCT
PM	31	AGAAATTTGGAGCCGTAAGATTGTGAGGAAACAATACTTGAAAAAACTCTTTGGCT
M13F	1	-----
M13R		-----
i6	241	AAGATTGATGTTATGGAGTTAGATCTTAGCTCAATGGCATCAGTCAGAAAATTTGCATCA
PM	91	AAGATTGATGTTATGGAGTTAGATCTTAGCTCAATGGCATCAGTCAGAAAATTTGCATCA
M13F	1	-----
M13R		-----
i6	301	GAGTACAATTCCTTGGGACTTCCTCTGAATCTCCTCATAAACAATGCAGGAGTAATGGCA
PM	151	GAGTACAATTCCTTGGGACTTCCTCTGAATCTCCTCATAAACAATGCAGGAGTAATGGCA
M13F	1	-----
M13R		-----
i6	361	GCTCCATATACTCTTTCGCAAGACGGAATAGAATTGCAATTTGCAACGAATCATTTAGGT
PM	211	GCTCCATATACTCTTTCGCAAGACGGAATAGAATTGCAATTTGCAACGAATCATTTAGGT
M13F	1	-----
M13R		-----
i6	421	CATTTTCTTCTGACAAATCTATTGTTGGAGACCATGAAAACCTACAGCTCGTCAAAGCAAT
PM	271	CATTTTCTTCTGACAAATCTATTGTTGGAGACCATGAAAACCTACAGCTCGTCAAAGCAAT
M13F	1	-----TCACCGACTTACATATAGTGAAGGC
M13R		-----
i6	481	AGAGAGGGCAGGATCATTAAATGTGTCATCAGAGGGTCACCGACTTACATATAGTGAAGGC
PM	331	AGAGAGGGCAGGATCATTAAATGTGTCATCAGAGGGTCACCGACTTACATATAGTGAAGGC
M13F	26	ATTCGATTTGATAAAAATTAACGATCAATCGAGCTACAACACTCTATATGCTTATGGACAG
M13R		-----
i6	541	ATTCGATTTGATAAAAATTAACGATCAATCGAGCTACAACACTCTATATGCTTATGCACAG
PM	391	ATTCGATTTGATAAAAATTAACGATCAATCGAGCTACAACACTCTATATGCTTATGGACAG
M13F	86	TCAAAGCTTTCTAACATTTTGCATGCTAATGAGCTGACGAGGCACTTGAAGGAAGATGGG
M13R		-----
i6	601	TCAAAGCTTTCTAACATTTTGCATGCTAATGAGCTGACGAGGCACTTGAAGGAAGATGGG
PM	451	TCAAAGCTTTCTAACATTTTGCATGCTAATGAGCTGACGAGGCACTTGAAGGAAGATGGG

M13F	146	GTGGAGATCACTGCTAATTCACCTTCATCCCGGATCAATCGCAACCAATCTTCTCCGTTAC
M13R		-----
i6	661	GTGGAGATCACTGCTAATTCACCTTCATCCCGGATCAATCGCAACCAATCTTCTCCGTTAC
PM	511	GTGGAGATCACTGCTAATTCACCTTCATCCCGGATCAATCGCAACCAATCTTCTCCGTTAC
M13F	206	CACAGTTATATTAACGCTATTGCCAATATGATTGGTAGATTTCGTGCTAAAAAATGTTGAG
M13R		-----
i6	721	CACAGTTATATTAACGCTATTGCCAATATGATTGGTAGATTTCGTGCTAAAAAATGTTGAG
PM	571	CACAGTTATATTAACGCTATTGCCAATATGATTGGTAGATTTCGTGCTAAAAAATGTTGAG
M13F	266	CAGGGAGCGGCGACTACATGTTATGTGGCACTGCATCCTCAAGTGAAGGGAGTAAGTGA
M13R		-----
i6	781	CAGGGAGCGGCGACTACATGTTATGTGGCACTGCATCCTCAAGTGAAGGGAGTAAGTGA
PM	631	CAGGGAGCGGCGACTACATGTTATGTGGCACTGCATCCTCAAGTGAAGGGAGTAAGTGA
M13F	326	GAATATTTTATGGACAGTAACATAGCCAAGCCGAGCTCCAAGGCAAAGATGCGTCGTTG
M13R		-----
i6	841	GAATATTTTATGGACAGTAACATAGCCAAGCCGAGCTCCAAGGCAAAGATGCGTCGTTG
PM	691	GAATATTTTATGGACAGTAACATAGCCAAGCCGAGCTCCAAGGCAAAGATGCGTCGTTG
M13F	386	GCCAAAAAGCTGTGGGATTTAGCTTGAGCTTAACCTCTCCAAACTAG
M13R		-----
i6	901	GCCAAAAAGCTGTGGGATTTAGCTTGAGCTTAACCTCTCCAAACTAG
PM	751	GCCAAAAAGCTGTGGGATTTAGCTTGAGCTTAACCTCTCCAAACTAG

**Figura 48** – Alinhamento da sequência obtida por bioinformática do transcrito 45855\_i6 (branco) com as sequências obtidas para cada primer M13F (azul), M13R (verde) e PM (laranja) nas reações de sequenciamento.

**Legenda:** Start códon (ATG) e stop códon (TAG) indicados em vermelho.

**Fonte:** elaborada pela autora.

```

M13F      1  -----
i1        1  ATG TTTGTTTTGGAAGGAAGGGCCCATCTGGGTCTCTGCGTCTTCTACGGCAGAGGAA
M13R      1  ATG TTTGTTTTGGAAGGAAGGGCCCATCTGGGTCTCTGCGTCTTCTACGGCAGAGGAA

M13F      1  -----
i1        61  GTGACACAAGGAATCGATGGCTCTGGCCTCACTGCCGTTATCACAGGGGCATCAAGTGGC
M13R      61  GTGACACAAGGAATCGATGGCTCTGGCCTCACTGCCGTTATCACAGGGGCATCAAGTGGC

M13F      1  -----
i1       121  ATAGGCGCTGAAACTGCACGCGTTCTTGCACTTCGCGGTGTTTCATGTATTTATGGCAGTT
M13R     121  ATAGGCGCTGAAACTGCACGCGTTCTTGCACTTCGCGGTGTTTCATGTATTTATGGCAGTT

M13F      1  -----
i1       181  AGGAACATGGCTGCTGGAAGACATGTCAAGAGGCAATAGTTAGGGAGATTCCCTAATGCA
M13R     181  AGGAACATGGCTGCTGGAAGACATGTCAAGAGGCAATAGTTAGGGAGATTCCCTAATGCA

M13F      1  -----
i1       241  AAAGTTGATATTTTGGAGTTGGATCTCAGTTCAATGGCATCTGTGAGAAAATTTGCATCG
M13R     241  AAAGTTGATATTTTGGAGTTGGATCTCAGTT-----

M13F      36  GATTACAGTGCTTCTCGTCATCCTCTGAATCTTCTAATTAACAATGCAGGTATCATTGGA
i1       301  GATTACAGTGCTTCTCGTCATCCTCTGAATCTTCTAATTAACAATGCAGGTATCATTGGA
M13R

M13F      96  GTCCCGTTTCATGCTTTCCAAAGACGACATAGAACTACATTTTGCAACTAACCACGTAGGC
i1       361  GTCCCGTTTCATGCTTTCCAAAGACGACATAGAACTACATTTTGCAACTAACCACGTAGGC
M13R

M13F     156  CATTTTTGTTAACGAGTCTTTTGCTAGAAACCATGAAGAAGACAGCACGTAACAGTAAT
i1       421  CATTTCTGTTAACGAGTCTTTTGCTAGAAACCATGAAGAAGACAGCACGTAACAGTAAT
M13R

M13F     216  AGAGAAGGAAGAATTGTTAATGTCGCCTCATGGGGTCATCGGTTGACTTATTGTGAAGGA
i1       481  AGAGAAGGAAGAATTGTTAATGTCGCCTCATGGGGTCATCGGTTGACTTATTGTGAAGGA
M13R

M13F     276  ATTTCGTTTTGATAAAAATCAATGATCCATCTGGGTACATGGGACCTCTTGCATATGGACAG
i1       541  ATTTCGTTTTGATAAAAATCAATGATCCATCTGGGTACATGGGACCTCTTGCATATGGACAG
M13R

M13F     336  TCAAAGCTTGCTAATGTTTTGCATGCTAATCAGCTTGCAAAAAATCTGAAGGCAGGAGTC
i1       601  TCAAAGCTTGCTAATGTTTTGCATGCTAATCAGCTTGCAAAAAATCTGAAGGCAGGAGTC
M13R

M13F     396  TTCATTCTCAAAAATAGAGCGATCGAGTGTTCTGCGTCGAATAGTGCTCATACTACGCT
i1       661  TTCATTCTCAAAAATAGAGCGATCGAGTGTTCTGCGTCGAATAGTGCTCATACTACGCT
M13R

M13F     456  CGGGAAAAAACTGA
i1       721  CGGGAAAAAACTGA
M13R

```

**Figura 49** – Alinhamento da sequência obtida por bioinformática do transcrito 52338\_i1 (branco) com as sequências obtidas para cada primer M13F (azul) e M13R (verde) nas reações de sequenciamento.

**Legenda:** Start códon (ATG) e stop códon (TGA) indicados em vermelho.

**Fonte:** elaborada pela autora.

M13R	1	ATGTTCTTTTGGGAAGGAAGAGCCCATCTGGGTCTCTGCGTCTTCTACGGCAGAGGAA
52338_i6	1	ATGTTCTTTTGGGAAGGAAGAGCCCATCTGGGTCTCTGCGTCTTCTACGGCAGAGGAA
M13F	1	-----
M13R	61	GTGACACAAGGAATCGATGGCTCTGGCCTCAGTGGCGTTATCACAGGGGCATCAAGTGGC
52338_i6	61	GTGACACAAGGAATCGATGGCTCTGGCCTCAGTGGCGTTATCACAGGGGCATCAAGTGGC
M13F	1	-----
M13R	121	ATAGGAGCTGAAACTGCACGGTTCTTGCACTTCGGGGTGTTCATGTATTTATGGCAGATT
52338_i6	121	ATAGGAGCTGAAACTGCACGGTTCTTGCACTTCGGGGTGTTCATGTATTTATGGCAGATT
M13F	1	-----
M13R	181	AGGAACATGGCTGCTGGAAGACATGTCAAGAGGCAATAGTTAGGGAGATTCCTAATGCA
52338_i6	181	AGGAACATGGCTGCTGGAAGACATGTCAAGAGGCAATAGTTAGGGAGATTCCTAATGCA
M13F	1	-----
M13R	241	AAAGTTGATATTTTGGAGTTGGATCTCAGTTCATGGCATCTGTGAGAAAATTTGCATCG
52338_i6	241	AAAGTTGATATTTTGGAGTTGGATCTCAGTTCATGGCATCTGTGAGAAAATTTGCATCG
M13F	1	-----CAGTTCATGGCATCTGTGAGAAAATTTGCATCG
M13R	301	GATTACAGTGTCTCTCGTCATCC-----
52338_i6	301	GATTACAGTGTCTCTCGTCATCCCTCTGAATCTTCTAATTAACAATGCAGGTATCATTGGA
M13F	35	GATTACAGTGTCTCTCGTCATCCCTCTGAATCTTCTAATTAACAATGCAGGTATCATTGGA
M13R		-----
52338_i6	361	GTCCCGTTCATGCTTTCCAAAGACGACATAGAACTACATTTTGCAACTAACACGTTAGGC
M13F	95	GTCCCGTTCATGCTTTCCAAAGACGACATAGAACTACATTTTGCAACTAACACGTTAGGC
M13R		-----
52338_i6	421	CATTTTCTGTTAACGAGTCTTTTGCTAGAAACCATGAAGAAGACAGCACGTAACAGTAAT
M13F	155	CATTTTCTGTTAACGAGTCTTTTGCTAGAAACCATGAAGAAGACAGCACGTAACAGTAAT
M13R		-----
52338_i6	481	AGAGAAGGAAGAATTGTTAATGTCGCCTCATGGGGTCATCGGTTGACTTATTGTGAAGGA
M13F	215	AGAGAAGGAAGAATTGTTAATGTCGCCTCATGGGGTCATCGGTTGACTTATTGTGAAGGA
M13R		-----
52338_i6	541	ATTTCGTTTTGATAAAATCAATGATCCATCTGGGTACATGGGACCTCTTGCATATGGACAG
M13F	275	ATTTCGTTTTGATAAAATCAATGATCCATCTGGGTACATGGGACCTCTTGCATATGGACAG
M13R		-----
52338_i6	601	TCAAAGCTTGCTAATGTTTTGCATGCTAATCAGCTTGCAAAAAATCTGAAGGCAGGAGTC
M13F	335	TCAAAGCTTGCTAATGTTTTGCATGCTAATCAGCTTGCAAAAAATCTGAAGGCAGGAGTC
M13R		-----
52338_i6	661	TTCATTCTCAAAAATAGAGCGATCGAGTGTCTGCGTCGAATAGTGCTCATACTACGCCT
M13F	395	TTCATTCTCAAAAATAGAGCGATCGAGTGTCTGCGTCGAATAGTGCTCATACTACGCCT
M13R		-----
52338_i6	721	CGGGAAAAAACTGA
M13F	455	CGGGAAAAAACTGA

**Figura 50** – Alinhamento da sequência obtida por bioinformática do transcrito 52338\_i6 (branco) com as sequências obtidas para cada primer M13F (azul) e M13R (verde) nas reações de sequenciamento.

**Legenda:** Start códon (ATG) e stop códon (TGA) indicados em vermelho.

**Fonte:** elaborada pela autora.